

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**

**FACULTAD DE VETERINARIA**

**Departamento de Bioquímica y Biología Molecular IV**



**TESIS DOCTORAL**

**Detección, caracterización y análisis funcional de la complejidad clonal  
en la tuberculosis humana y bovina**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTORA

PRESENTADA POR

**Yurena Navarro García**

Directores

**Darío García de Viedma del Álamo  
Lucía de Juan Ferré**

**Madrid, 2016**

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE VETERINARIA

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular IV

HOSPITAL GENERAL UNIVERSITARIO GREGORIO MARAÑÓN/INSTITUTO DE  
INVESTIGACIÓN SANITARIA GREGORIO MARAÑÓN

Servicio de Microbiología Clínica y Enfermedades Infecciosas

CENTRO DE VIGILANCIA SANITARIA VETERINARIA (VISAVET)

Servicio de Micobacterias



TESIS DOCTORAL

**Detección, caracterización y análisis funcional de la  
complejidad clonal en la tuberculosis humana y bovina**

Memoria para optar al grado de Doctor presentada por

**Yurena Navarro García**

Bajo la dirección de los Doctores:

**Darío García de Viedma del Álamo y Lucía de Juan Ferré**

Madrid, 2015



# UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID



Darío García de Viedma del Álamo, Doctor en Ciencias Biológicas y adjunto especialista del Departamento de Microbiología Clínica y Enfermedades Infecciosas del Hospital General Universitario Gregorio Marañón; y Lucía de Juan Ferré, Doctora por la Universidad Complutense de Madrid, profesora visitante del Departamento de Sanidad Animal de la Facultad de Veterinaria y Subdirectora del Centro de Vigilancia Sanitaria Veterinaria (VISAVET) de la Universidad Complutense de Madrid,

CERTIFICAN:

Que la tesis doctoral que lleva por título **“Detección, caracterización y análisis funcional de la complejidad clonal en la tuberculosis humana y bovina”** ha sido realizada por la licenciada en Veterinaria Yurena Navarro García en el Servicio de Microbiología Clínica y Enfermedades Infecciosas del Hospital General Universitario Gregorio Marañón/ Instituto de Investigación Sanitaria Gregorio Marañón, y en el Centro de Vigilancia Sanitaria Veterinaria (VISAVET) de la Universidad Complutense de Madrid, y estimamos que reúne los requisitos exigidos para optar al título de Doctor por la Universidad Complutense .

Fdo:

Darío García de Viedma del Álamo

Lucía de Juan Ferré





Tras 6 años de trabajo llego a esta etapa final habiendo crecido profesional y personalmente, gracias, en gran medida, a las personas que me han rodeado, enseñándome y apoyándome en todo momento.

En primer lugar, agradecer a mis directores de tesis por haberme guiado durante estos años. A Darío García de Viedma, por haberme dado la oportunidad de emprender mi carrera investigadora al acogerme recién salida del "casarón" y confiar en mí. Gracias por enseñarme todo lo que sabes, con paciencia y dedicación; por tu exigencia y por forzarme a sacar siempre lo mejor de mí. A Lucía de Juan, por permitir introducirme en el mundo animal y no olvidarme así de mi lado veterinario. Gracias a ambos por su gran labor docente y por el apoyo profesional y personal.

Gracias al Dr. Emilio Bouza y a todos los miembros del Servicio de Microbiología y Enfermedades Infecciosas del Hospital Gregorio Marañón, así como al Dr. Lucas Domínguez y al personal de VISAVET, por permitirme desarrollar experimentalmente esta tesis y por prestarme su apoyo siempre que lo he necesitado. En particular gracias a M<sup>a</sup> Jesus y sus chicas: Choni, Lola, Raquel y Yolanda, por compartir el espacio y ayudarme en todo. Gracias a Javi y Fernando, por prestarnos su ayuda siempre que la necesitamos, así como al personal del animalario, particularmente a Paco. Muchas gracias al grupo de micobacterias "visavetiano", y con especial mención a Bea y Fran, por estar ahí para todo lo que les pedía, e igualmente al equipo de bioseguridad, particularmente a María y Laura, por ayudar a esta novata que no tenía ni idea del mundo "ratonero".

También quisiera agradecer a Miguel Martínez Lirola y Juan José Palacios por su admirable disposición, en todo momento, a colaborar en los numerosos proyectos. Ha sido un placer trabajar con ustedes.

Por supuesto mil gracias a mis compañeras y amigas, Laura y Marta, que han estado ahí desde el principio hasta el final, para todo y en todo momento, os llevo en el corazón. Gracias porque sin vosotras no podría haber llevado a cabo esta tesis. A Laura gracias por su paciencia, por resolver mis dudas y enseñarme siempre, por compartir mis alegrías y las que no lo son tanto, me enternizaría. Gracias por todo. Y Martita, mi compañera de batallas, gracias por ser mi "profe" esos primeros años y también por aprender conmigo ¡qué momentos inolvidables hemos vivido!, ¡me los llevo todos!

*También quisiera agradecer a Cris, Rafi y María por todos los buenos momentos que hemos pasado ¡sois las mejores! A Adrián y Belén, compañeros y amigos siempre dispuestos a escucharme cuando los necesito; y a Pilar y Laura, por vuestras visitas más o menos fugaces al laboratorio, que nos oxigenan. Y no quisiera olvidarme de las personas que en un pasado compartieron algún tiempo conmigo, de las cuales aprendí y a las cuales siempre recordaré: a María y Sandra, y, especialmente a Sandrix e Iria, por apoyarme y motivarme cuando lo necesité.*

*Finalmente, agradecer a todas las personas, familia y amigos, que siempre han estado ahí para ayudarme en todo, día a día. Gracias a mis padres y hermanas por su apoyo y ánimo infinitos; y a Gabriel, por todo lo que no encuentro a expresar, mil gracias.*

## ÍNDICE

---



INTRODUCCIÓN.....	1
1. Complejo <i>Mycobacterium tuberculosis</i> : aspectos generales.....	3
1.1. <i>Mycobacterium tuberculosis</i> .....	4
1.2. <i>Mycobacterium africanum</i> .....	5
1.3. <i>Mycobacterium canetti</i> .....	5
1.4. <i>Mycobacterium bovis</i> .....	6
1.4.1. <i>Mycobacterium bovis</i> BCG.....	6
1.5. <i>Mycobacterium caprae</i> .....	7
1.6. <i>Mycobacterium microti</i> .....	7
1.7. <i>Dassie bacillus</i> .....	8
1.8. <i>Mycobacterium pinnipedii</i> .....	8
1.9. <i>Mycobacterium mungi</i> .....	8
1.10. <i>Mycobacterium orygis</i> .....	9
1.11. <i>Mycobacterium suricattae</i> .....	9
2. Tuberculosis causada por <i>Mycobacterium tuberculosis</i> .....	10
2.1. Patogenia.....	10
2.2. Diagnóstico.....	11
2.2.1. Diagnóstico clínico de la tuberculosis activa.....	11
2.2.2. Diagnóstico de la tuberculosis latente.....	12
2.2.3. Diagnóstico microbiológico.....	13
2.3. Tratamiento.....	16
2.3.1. Tratamiento de la tuberculosis sensible.....	17
2.3.2. Tratamiento de la tuberculosis resistente.....	17
2.4. Situación actual de la infección por <i>Mycobacterium tuberculosis</i> en humanos.....	18
2.5. Zooantroponosis.....	21

3. Tuberculosis causada por <i>Mycobacterium bovis</i> .....	23
3.1. Patogenia.....	23
3.2. Diagnóstico.....	24
3.2.1. Diagnóstico clínico de la tuberculosis.....	24
3.2.2. Diagnóstico inmunológico.....	24
3.2.3. Diagnóstico anatomopatológico.....	25
3.2.4. Diagnóstico microbiológico.....	25
3.3. Situación actual de la infección por <i>M. bovis</i> en animales.....	26
3.4. Antropozoonosis.....	28
4. Genotipado de tuberculosis.....	29
4.1. Herramientas moleculares de tipado.....	29
4.1.1. RFLP-IS6110.....	29
4.1.2. MIRU-VNTR.....	31
4.1.3. Espoligotipado.....	32
4.1.4. Secuenciación del genoma completo.....	34
4.2. Aplicaciones del genotipado del complejo <i>Mycobacterium tuberculosis</i> .....	35
4.2.1. Estudio de contaminaciones cruzadas de laboratorio.....	35
4.2.2. Estudio de recurrencias: reactivación vs reinfección.....	35
4.2.3. Epidemiología molecular.....	36
4.2.4. Análisis de la complejidad clonal de la tuberculosis.....	37
5. Virulencia de los miembros del complejo <i>Mycobacterium tuberculosis</i> .....	39
5.1. Factores de virulencia en el complejo <i>Mycobacterium tuberculosis</i> .....	39
5.1.1. Proteínas de envoltura y secreción.....	39
5.1.2. Enzimas de metabolismo celular.....	40
5.1.3. Reguladores transcripcionales.....	40

5.2. Ensayos de evaluación de virulencia.....	41
5.2.1. Modelos celulares.....	41
5.2.2. Modelos <i>in vivo</i> .....	41
ORGANIZACIÓN DE LA TESIS.....	45
OBJETIVOS.....	51
CAPÍTULO I. Caracterización de la complejidad clonal existente en infecciones causadas por <i>Mycobacterium tuberculosis</i> y evaluación de su significado funcional.....	55
1. Systematic survey of clonal complexity in tuberculosis at a populational level and detailed characterization of the isolates involved.....	61
2. Differences in gene expression between clonal variants of <i>Mycobacterium tuberculosis</i> emerging as a result of microevolution.....	69
3. Unmasking subtle differences in the infectivity of microevolved <i>Mycobacterium tuberculosis</i> variants coinfecting the same patient.....	73
CAPÍTULO II. Estudio exhaustivo de eventos de complejidad clonal en casos clínicos seleccionados.....	77
4. Co-Infection with Drug-Susceptible and Reactivated Latent Multidrug-Resistant <i>Mycobacterium tuberculosis</i> .....	83
5. In-depth characterization of <i>Mycobacterium tuberculosis</i> clonal variants from a recurrent patient.....	87
6. Persistent infection by a <i>Mycobacterium tuberculosis</i> advantageous strain responsible for a massive outbreak.....	107
CAPÍTULO III. Caracterización de la complejidad clonal en infecciones causadas por <i>Mycobacterium bovis</i> .....	115
7. High-throughput multiplex MIRU-VNTR typing of <i>Mycobacterium bovis</i> .....	121
8. Multiple sampling and discriminatory fingerprinting reveals clonally complex and compartmentalized infections by <i>M. bovis</i> in cattle.....	125
9. Detailed chronological analysis of microevolution events in herds infected persistently by <i>Mycobacterium bovis</i> .....	131



DISCUSIÓN.....	151
CONCLUSIONES.....	169
RESUMEN/SUMMARY.....	173
ABREVIATURAS.....	185
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	189

## INTRODUCCIÓN

---



## 1. Complejo *Mycobacterium tuberculosis*: aspectos generales

Los representantes del complejo *Mycobacterium tuberculosis* (MTBC) forman parte del género *Mycobacterium* y se caracterizan por ser bacilos inmóviles, no esporulados, ácido alcohol resistentes y con una lenta división celular (16-20 horas). Su ADN contiene un alto contenido de guanina+citosina (61-71%) y su pared es rica en lípidos, entre los que se encuentran los ácidos micólicos (Boddinghaus et al., 1990).

Existen varios sistemas de clasificación de las micobacterias del complejo que están basados en características fenotípicas, sin embargo actualmente, la clasificación más ampliamente utilizada atiende a sus características genómicas. Así, las micobacterias del MTBC se han dividido en distintas especies o miembros según la presencia de deleciones en ciertas regiones del cromosoma (*Regions of Difference*, RD) (Gordon et al., 1999) y a la presencia de polimorfismos puntuales en determinados genes (*Single Nucleotide Polymorphism*, SNP) (Figura 1).

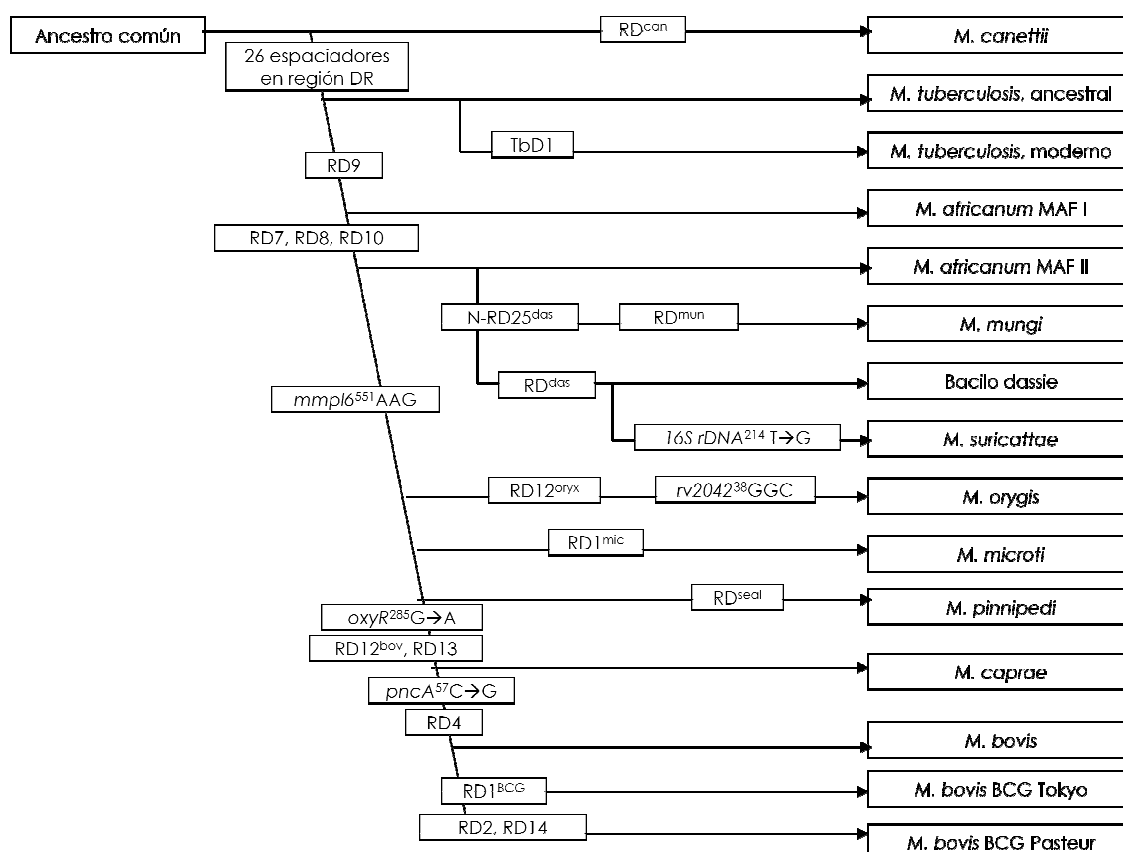


Figura 1. Filogenia del MTBC basada en la presencia o deleción de regiones de diferencia y en polimorfismos genéticos (van Ingen et al., 2012).

Todas las micobacterias del MTBC presentan una homología de secuencia del genoma del 99,95%, la cual asciende al 100% en la subunidad 16s del ARNr (Behr and Mostowy, 2007; Brosch et al., 2002; Gutacker et al., 2002). Las especies que se engloban en este complejo son: *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium africanum*, *Mycobacterium canettii*, que tradicionalmente causan enfermedad en el hombre, *Mycobacterium bovis*, *Mycobacterium caprae*, *Mycobacterium microti*, el bacilo "dassie", *Mycobacterium pinnipedi* y *Mycobacterium mungi* que causan tuberculosis en distintos animales. En los últimos años, se han descrito dos nuevas especies: *Mycobacterium orygis* y *Mycobacterium suricattae*, además de una nueva cepa aislada de chimpancé en Costa de Marfil (África) (Coscolla et al., 2013)(Figura 1).

### 1.1. *Mycobacterium tuberculosis*

*Mycobacterium tuberculosis* (MTB) es el agente infeccioso responsable de la tuberculosis (TB) en humanos y primates. Se aisló por primera vez en 1882 por el microbiólogo Robert Koch (Sakula, 1982). Es una micobacteria fototrófica, heterotrófica y aeróbica, si bien ha sido descrito que, durante el curso de la infección en ratones, MTB es capaz de cambiar el metabolismo, creciendo en microaerofilia y utilizando lípidos como fuente de carbono.

La cepa de referencia utilizada para la realización de numerosos estudios es la cepa H37Rv, cuyo genoma se publicó en 1998 (Cole et al., 1998). Su tamaño es de 4.411.532 pares de bases, y contiene 3.999 genes, de los cuales se ha caracterizado la función del 40% de ellos (Galagan et al., 2010; Reddy et al., 2009). Esta cepa surgió a partir de una cepa parental (H37) aislada del esputo de un paciente con TB. Veintidós años después de su aislamiento, algunos laboratorios detectaron una disminución en su virulencia probablemente atribuida a las modificaciones en la composición del medio de crecimiento (Steenken y Gardner, 1946). Aprovechando esta observación, Steenken utilizó diferentes condiciones de crecimiento de H37 para disociar de forma estable las variantes avirulentas (H37Ra) y virulentas (H37Rv) (Steenken et al., 1934).

Además de afectar a humanos y primates también se ha descrito como agente responsable de TB en distintos animales como vacas (Jenkins et al., 2011; Mittal et al., 2014; Thakur et al., 2012), cabras (Jenkins et al., 2011; Kassa et al., 2012), cerdos (Jenkins et al., 2011; Mohamed et al., 2009), perros (Engelmann et al., 2014; Martinho et al., 2013), aves (Hoop, 2002; Lanteri et al., 2011) y elefantes (Paudel et al., 2014; Vogelnest et al., 2015).

## 1.2. *Mycobacterium africanum*

*Mycobacterium africanum* (*M. africanum*) fue descrito por primera vez a finales de 1960 por Castets (Castets et al., 1968; Castets y Sarrat, 1969) como una micobacteria que, al igual que MTB, es sensible a pirazinamida (PZA), pero que se diferencia principalmente por ser nitrato negativa y por ser capaz de crecer en microaerofilia en medios suplementados con piruvato. Sin embargo, *M. africanum* conduce a resultados variables en la caracterización bioquímica clásica, complicando su propia clasificación. Esto es debido a la presencia de distintos subtipos que han sido clasificados gracias al genotipado molecular en: *Mycobacterium africanum* tipo I West African 1 (MAF1) y *Mycobacterium africanum* tipo I West African 2 (MAF2) (de Jong et al., 2010). En los últimos años, *Mycobacterium africanum* tipo II ha sido reclasificado como *M. tuberculosis sensu stricto* genotipo Uganda (de Jong et al., 2010).

Se ha descrito que *M. africanum* se encuentra afectando principalmente a humanos de África occidental. Su prevalencia alcanza cifras del 39% para MAF1 en Benin o del 51% para MAF2 en Guinea Bissau (de Jong et al., 2010). En Europa se han notificado casos esporádicos de TB por *M. africanum*, mayoritariamente en casos inmigrantes procedentes del oeste de África. Del mismo modo, la infección en animales por este patógeno es anecdótica, afectando principalmente a ganado vacuno de África occidental (Cadmus et al., 2006; Cadmus et al., 2010; Rahim et al., 2007).

## 1.3. *Mycobacterium canetti*

*Mycobacterium canetti* (*M. canetti*) fue descrito por Van Soolingen en 1997 (van Soolingen et al., 1997). Es conocido como el bacilo liso del complejo debido a que produce colonias lisas y brillantes. Además, su pared está compuesta por unos lipooligosacáridos y fenolglucolípidos característicos que lo diferencian claramente del resto de miembros del complejo. Recientemente se ha demostrado su resistencia intrínseca a la PZA (Feuerriegel et al., 2013). Diversos estudios muestran mayor tasa de división *in vitro* (Supply et al., 2013; van Soolingen et al., 1997) que MTB. Un estudio actual ha visto que es menos persistente que MTB en la infección en ratones (Supply et al., 2013). Se ha aislado esporádicamente (actualmente hay menos de 100 aislados descritos) y mayoritariamente de pacientes originarios de África del Este.

#### 1.4. *Mycobacterium bovis*

*Mycobacterium bovis* (*M. bovis*) es el principal patógeno responsable de la TB bovina (TBb). A pesar de conocerse clásicamente como productor de esta enfermedad, no fue hasta 1968 cuando fue descrito por primera vez (Karlson y Lessel, 1970). Como diferencias fundamentales con MTB se encuentra su resistencia intrínseca a PZA, su mejor crecimiento en medios enriquecidos con piruvato (ya que no es capaz de metabolizar el glicerol) y su capacidad para crecer en ambientes microaerófilos. Hace algo más de una década se publicó el genoma de la cepa AF2122/97 (Garnier et al., 2003), que actualmente es considerada como referencia. Debido a la delección de un variado número de regiones de diferencia presenta un menor tamaño genómico con respecto a MTB.

Su hospedador principal son los animales pertenecientes a la subfamilia *Bovinae* (géneros *Bison*, *Bos* y *Bubalus* principalmente), pero se ha aislado de gran diversidad de animales, así como del ser humano (Adesokan et al., 2012; Corcoran et al., 2014; Jenkins et al., 2011; Jiang et al., 2015) y otros primates no humanos (Keet et al., 2000; Thorel et al., 1998). Otros animales en los que causa enfermedad son los pertenecientes a las subfamilias *Caprinae*, principalmente cabras y, en menor medida, ovejas (Higino et al., 2011; Jenkins et al., 2011; Marianelli et al., 2010; Munoz Mendoza et al., 2012; Zanardi et al., 2013) y *Suinae*, principalmente cerdos y jabalíes (Jenkins et al., 2011; Mohamed et al., 2009; Muwonge et al., 2012; Parra et al., 2003; Zanella et al., 2008). Asimismo se ha aislado de otros animales como caballos (Monreal et al., 2001; Sarradell et al., 2015), perros (Etienne et al., 2013; Shrikrishna et al., 2009) y gatos (Murray et al., 2015; Ramdas et al., 2015; Roberts et al., 2014).

##### 1.4.1. *Mycobacterium bovis* BCG

En 1921, en el instituto Pasteur, Albert Calmette y Camille Guérin, tras someter a una cepa de *M. bovis* a 230 pases sucesivos (entre 1908 y 1921) en un medio con patata y glicerol, produjeron una variante atenuada a la que nombraron como BCG (*Bacillus* de Calmette y Guérin) (Renvoise et al., 2014). Desde entonces, *M. bovis* BCG ha sido utilizada como vacuna en todo el mundo. Sin embargo, existen distintas cepas BCG ya que, desde su primera distribución a los distintos laboratorios, hasta la introducción de la liofilización en la década de los 60, cada laboratorio mantuvo su propia BCG mediante subcultivos sucesivos, produciéndose una deriva genética. De esta forma, las 6 cepas principales, que representan más del 90% de la vacuna producida, son Pasteur 1173 P2, DANISH 1331, Glaxo 1077, Russian BCG-I, Tokyo 172-1, y Moreau RDJ (Singh et al., 2015). Éstas se

diferencian genéticamente entre sí por tener distinto número de RDs, así como diferentes duplicaciones en tándem y SNPs (Copin et al., 2014).

Existen estudios en humanos y animales que evidencian la diferente capacidad de la vacuna BCG para inducir la respuesta inmune celular específica. Por ello, la eficacia en adultos oscila entre el 0 y el 80% (Fine, 1995), siendo más eficaz en prevenir la TB diseminada y la meningitis tuberculosa en niños (52-100%) (Trunz et al., 2006). Por este motivo, su aplicación actual está mayoritariamente restringida a los recién nacidos de países en vías de desarrollo o de países en los que la TB es endémica. Adicionalmente, se ha descrito el uso de BCG como adyuvante en la quimioterapia para pacientes con cáncer de vejiga debido a los beneficios derivados de la estimulación del sistema inmune (Kamat et al., 2015).

### 1.5. *Mycobacterium caprae*

*Mycobacterium caprae* (*M. caprae*) fue descrito por primera vez en 1999 por Aranaz (Aranaz et al., 1999) como una micobacteria aislada de cabras españolas (*M. tuberculosis* subsp. *caprae* subsp. nov). Y no fue hasta el año 2003 cuando fue propuesta como un miembro del complejo debido a que estudios realizados sobre la evolución del MTBC demostraron que el grupo de aislamientos caprinos está menos evolucionado que su, hasta ese momento considerado, ancestro *M. bovis* (Aranaz et al., 2003; Brosch et al., 2002). Es una micobacteria caracterizada por ser negativa a la reducción del nitrato y a la acumulación de niacina, sensible a la PZA y resistente a la hidracida del ácido 2-tiofenolcarboxílico a bajas concentraciones (2µg/ml).

Aunque su hospedador principal son las cabras, se ha aislado de otros animales rumiantes (vacas, ovejas, ciervos) (Lamine-Khemiri et al., 2014; Rodríguez et al., 2011; Schoepf et al., 2012) así como de cerdos, jabalíes (García-Jiménez et al., 2013; Rodríguez et al., 2011) e incluso humanos (Gutiérrez et al., 1997; Kubica et al., 2003; Prodinger et al., 2005).

### 1.6. *Mycobacterium microti*

*Mycobacterium microti* (*M. microti*), causante de la TB en ratones de campo, se describió por primera vez en 1937 por el doctor A. Q. Wells (Wells y Oxen, 1937). Las principales diferencias fenotípicas frente a MTB son su incapacidad para reducir nitratos y el aspecto liso de las colonias. Los reservorios naturales de *M. microti* son roedores, principalmente ratones de campo (*Apodemus sylvaticus*), topillos agrestes (*Microtus agrestis*) y rojos (*Myodes glareolus*) y musarañas (*Sorex araneus*). Sin embargo, cada vez



son más los mamíferos, tanto salvajes como domésticos, en los que *M. microti* causa enfermedad. Se han descrito casos en gatos (Laprie et al., 2013; Rufenacht et al., 2011), perros (Deforges et al., 2004), cerdos (Huitema y Jaartsveld, 1967; Taylor et al., 2006), jabalíes (Boniotto et al., 2014), camellos (Lyashchenko et al., 2011; Zanolari et al., 2009), monos (Henrich et al., 2007), llamas (Xavier Emmanuel et al., 2007), suricatos (Palgrave et al., 2012), etc. Igualmente, se han descrito numerosos casos de TB en humanos, tanto inmunocomprometidos como inmunocompetentes, causados por este patógeno (Frank et al., 2009; Niemann et al., 2000; Panteix et al., 2010; Xavier Emmanuel et al., 2007).

*M. microti* se postuló como vacuna potencial contra la TB humana. Sin embargo, tras realizar estudios en adolescentes y recién nacidos, se demostró que, aunque era segura, no fue más eficaz que la actual vacuna BCG (Hart y Sutherland, 1977; Sula y Radkovsky, 1976).

### 1.7. *Dassie bacillus*

El primer caso de TB causado por el bacilo dassie ocurrió en la década de los 50 en los damanes de El Cabo (*Procavia capensis*) (Smith, 1960; Wagner et al., 1958). Esta variante poco frecuente del complejo se caracteriza por presentar mayor similitud genética con *M. microti* en comparación con MTB (Mostowy et al., 2004). Nunca se ha documentado su infección en humanos aunque la importación de estos animales a distintos zoológicos podría producir la aparición de esta enfermedad en el hombre.

### 1.8. *Mycobacterium pinnipedii*

En 2003 se identificó a *Mycobacterium pinnipedii* (*M. pinnipedii*) como una nueva especie del complejo que producía TB en pinnípedos (principalmente focas y leones marinos) (Cousins et al., 2003). Además de describirse infecciones en estos animales también se han descrito casos en el ganado vacuno (Loeffler et al., 2014), tapires (Jurczynski et al., 2011), camellos (Moser et al., 2008) y humanos (Kiers et al., 2008; Thompson et al., 1993).

### 1.9. *Mycobacterium mungi*

En 2010 se identificó a *Mycobacterium mungi* (*M. mungi*) como el agente causal de la TB en mangostas tras la aparición de siete brotes con una elevada tasa de mortalidad (Alexander et al., 2010). La transmisión de este patógeno, al contrario del resto de miembros del complejo, parece no ocurrir a través de la vía respiratoria, sino a través de la mucosa nasal, donde provoca lesiones granulomatosas. Sin embargo, debido a la

escasa literatura existente con respecto a este patógeno, no se ha llegado a una conclusión definitiva al respecto. Hasta la fecha no se ha descrito que cause enfermedad en otros animales y tampoco existe información disponible sobre su potencial patogénico. Además, las pruebas bioquímicas no son suficientes para diferenciar a *M. mungi* de MTB por lo que su diferenciación descansa en métodos moleculares.

#### 1.10. *Mycobacterium orygis*

*Mycobacterium orygis* (*M. orygis*) es un miembro del complejo que ha sido recientemente descrito por Van Ingen (Gey van Pittius et al., 2012; van Ingen et al., 2012). Anteriormente era conocido como el bacilo oryx, causante de la TB en los órices (género *Oryx*). Actualmente, además de infectar a órices, se ha descrito en gacelas, vacas, monos y hombre (Dawson et al., 2012). Sin embargo, su rango de hospedadores puede ser más amplio ya que la mutación *gyrB*1450 (guanina→timina), marcador en el que descansa la identificación de *M. africanum* en la mayor parte de tests comerciales, parece encontrarse igualmente en *M. orygis*.

#### 1.11. *Mycobacterium suricattae*

Este miembro del complejo, *Mycobacterium suricattae* (*M. suricattae*), ha sido recientemente descrito por Parsons como causante de TB en suricatos (*Suricata suricatta*) (Parsons et al., 2013). Está genéticamente relacionado con el bacilo dassie aunque parece ser más virulento.

## 2. Tuberculosis causada por *Mycobacterium tuberculosis*

*Mycobacterium tuberculosis* (MTB) es el agente causal de la tuberculosis (TB) humana. Ésta es una enfermedad infecciosa granulomatosa crónica que se produce por la inhalación de aerosoles que porten el bacilo tuberculoso (gotas de Flügge) generados por pacientes bacilíferos al toser o estornudar (Grupo de trabajo de la Guía de Práctica Clínica sobre el Diagnóstico, 2009). Se calcula que solo un 10% de las personas que se infectan con el bacilo tuberculoso desarrollarán la enfermedad (Lozano, 2002; WHO, 2014a). Entre los factores que influyen en la infección del paciente podemos encontrar el tiempo total de exposición, el tamaño de las partículas aerosolizadas, la persistencia de los aerosoles en suspensión y, finalmente, el número de bacilos inhalados. Dentro del 10% de pacientes infectados, el 80% manifestará la enfermedad durante los dos primeros años posteriores al primer contacto con el bacilo (primoinfección). Los factores de riesgo que favorecen el desarrollo de la enfermedad son aquellos que disminuyen la inmunidad, como son la diabetes, el SIDA, la malnutrición, el abuso de alcohol y las malas condiciones de vida así como otros trastornos crónicos. Otro factor de riesgo es el tabaquismo; así, se calcula que más del 20% de los casos de TB son atribuibles al hábito de fumar (WHO, 2014a). De esta forma, según el balance entre la respuesta del sistema inmunitario del paciente y la exposición a MTB, se distinguen tres situaciones diferentes (Lozano, 2002):

- *Exposición sin infección.* No se desarrolla respuesta inmunitaria y no hay evidencia de enfermedad.

- *Infección sin enfermedad o latente.* Se produce reacción inmunitaria aunque sin evidencia de enfermedad.

- *Enfermedad activa.* Se desarrollan los síntomas y signos clínicos y radiográficos de la TB y se produce la confirmación bacteriológica de la presencia del bacilo.

### 2.1. Patogenia

Una vez el bacilo es inhalado y llega a los alveolos, se desencadena una serie de respuestas tisulares e inmunológicas conocidas como primoinfección tuberculosa. En primer lugar, se produce un foco de alveolitis exudativa (Lozano, 2002); en donde los macrófagos comienzan a eliminar a las micobacterias. En las 2-10 semanas posteriores a la infección se pone en marcha una respuesta inmunológica celular desencadenada por los antígenos de la membrana y del citoplasma de las micobacterias. En este momento, se produce el característico granuloma tuberculoso, el cual es un agregado compacto y

organizado de células inmunes [macrófagos infectados y no infectados, macrófagos espumosos, células epitelioides y células gigantes multinucleadas (células de Langerhans) rodeado por un anillo de linfocitos T] (Silva Miranda et al., 2012). Al cabo de un tiempo el granuloma se licúa en su centro y deja un núcleo de necrosis caseosa.

Llegados a este punto, si el sistema inmune es capaz de controlar la infección, el granuloma se reabsorbe y calcifica, y el individuo no llega a desarrollar la enfermedad aunque sí ha desarrollado una respuesta inmune (infección latente). Por el contrario, si el sistema inmune del paciente se encuentra deprimido, el bacilo será capaz de replicarse y producir enfermedad activa.

## 2.2. Diagnóstico

### 2.2.1. Diagnóstico clínico de la tuberculosis activa

En un paciente con TB activa, el diagnóstico clínico dependerá del tipo de TB:

- *Tuberculosis pulmonar*. Es la manifestación clínica más común de la TB, y representa el 80-85% de los casos. Se presenta con signos respiratorios como tos seca o productiva, expectoración con o sin hemoptisis, dolor torácico y síntomas generales: anorexia, astenia, adinamia, sudoración nocturna, pérdida de peso y a veces fiebre prolongada (Grupo de trabajo de la Guía de Práctica Clínica sobre el Diagnóstico, 2009). Los hallazgos en la radiografía y la tomografía computerizada torácicas, aunque inespecíficos, son un fiel reflejo de las alteraciones estructurales del pulmón y tórax. En la radiografía se pueden observar infiltrados u opacidades parenquimatosas, adenopatías, atelectasia segmentaria o derrame pleural (generalmente unilateral) (Gonzalez-Martin et al., 2010).

- *Tuberculosis extrapulmonar*. Representa el 15-20% de todos los casos, pudiendo llegar al 60% en pacientes inmunocomprometidos (Fanlo y Tiberio, 2007). En la mayoría de los casos de TB extrapulmonar existe un foco primario en el pulmón, del cual se produce una diseminación por, contigüidad, vía linfática o vía hematógena. Esta última es la causante de la mayoría de las TB extrapulmonares, a excepción de la pleural y la linfática. La TB pleural es la TB extrapulmonar más frecuente, y el signo clínico más característico es el derrame pleural, que se presenta con un cuadro de tos, febrícula y dolor torácico de características pleuríticas (Grupo de trabajo de la Guía de Práctica Clínica sobre el Diagnóstico, 2009). Otras localizaciones extrapulmonares son la ganglionar, urogenital y osteoarticular. El resto de localizaciones es muy infrecuente, no obstante, en caso de producirse, los síntomas clínicos dependerán del órgano afectado:

trastornos digestivos, hematológicos (anemia, linfopenia, trombocitopenia) hepatoesplenomegalia, signos meníngeos, etc.

Debido a la diseminación hematógena del bacilo, pueden encontrarse afectados simultáneamente múltiples órganos. En este caso, el paciente presenta una TB diseminada en la que se observa un gran deterioro del estado general: fiebre, disnea y astenia; acompañados de los signos clínicos específicos de los órganos afectados, en donde se producen pequeños nódulos (Gonzalez-Martin et al., 2010). En las formas agudas se puede producir el síndrome del distrés respiratorio del adulto (Grupo de trabajo de la Guía de Práctica Clínica sobre el Diagnóstico, 2009). En las evoluciones crónicas está comprometido el estado general y se produce fiebre de origen desconocido. La radiología torácica puede presentar el patrón “en grano de mijo” con pequeños nódulos pulmonares. La tomografía computerizada es útil para demostrar lesiones no visibles en la radiología convencional (Gonzalez-Martin et al., 2010).

#### 2.2.2. Diagnóstico de la tuberculosis latente

El diagnóstico en pacientes con TB latente se basa en la detección de la respuesta inmune a MTB. Este diagnóstico se puede hacer directamente sobre el paciente (prueba de la tuberculina), o indirectamente *in vitro*, a partir de una muestra de sangre del paciente [detección del interferón gamma (IGRA)].

- Prueba de la tuberculina o método de *Mantoux*: es ampliamente utilizada por su bajo coste económico y su fácil realización. Consiste en la administración intradérmica de un derivado proteico purificado (PPD) de MTB. Tras 48-72 horas, en caso de exposición previa con el bacilo, se observará una induración (mayor o igual a 5 mm de diámetro) provocada como consecuencia de la reacción inmunológica del paciente. Hay que tener en cuenta que, en casos de infección por bacterias no tuberculosas o pacientes vacunados con BCG, la prueba puede ser positiva, por lo que se deberá considerar esta reacción como falso positivo. De la misma manera, se pueden producir falsos negativos en casos de infección reciente (entre 8 y 10 semanas tras el contacto) o muy antigua, así como en menores de seis meses, pacientes inmunodeprimidos o en caso de una incorrecta aplicación de la prueba (CDC, 2000).

- Detección del interferón gamma (IGRA). Se basa en la detección del interferón gamma (IFN- $\gamma$ ) tras la sensibilización *in vitro* con antígenos específicos de MTB (ESAT-6, CFP-10). Actualmente existen dos kits comerciales para su realización: el T-SPOT®.TB y el QuantiFERON®-TB Gold. El primero de ellos requiere de la separación de las células mononucleares sanguíneas, las cuales, tras ser estimuladas con ambos antígenos, son

analizadas mediante la técnica de ELISPOT, en la cual cada punto representa una célula T secretora de IFN- $\gamma$  (CDC, 2010). El QuantiFERON®-TB Gold estimula la sangre total incubada con, además de los dos antígenos ESAT-6 y CFP-10, un tercer antígeno (TB7.7) y, mediante ELISA, determina la cantidad de IFN- $\gamma$ . Estos métodos son más específicos que la prueba de la tuberculina además de producir menos reacciones cruzadas con la vacunación y permitir una interpretación objetiva de los resultados (Grupo de trabajo de la Guía de Práctica Clínica sobre el Diagnóstico, 2009).

### 2.2.3. Diagnóstico microbiológico

El objetivo del diagnóstico microbiológico es el aislamiento e identificación del organismo causante de la enfermedad. En el caso de la TB pulmonar es necesario obtener dos esputos, preferiblemente tres, del paciente en días consecutivos (WHO, 2006). En los niños, la obtención de un esputo adecuado es difícil, por lo que el aspirado gástrico se considera una muestra válida. También son válidas otras muestras de origen pulmonar como lavados bronquial y broncoalveolar así como contenido gástrico (WHO, 2006). En casos de TB extrapulmonar, se recogerán las muestras correspondientes al órgano afectado: orina, líquido cefalorraquídeo, sangre, médula ósea, etc.

- *Microscopía*: Mediante la realización de la baciloscopia de las muestras del paciente se busca visualizar el bacilo. Las micobacterias son difíciles de teñir con los colorantes básicos habituales debido al alto contenido de lípidos de su pared celular, especialmente a los ácidos micólicos, sin embargo, gracias a su ácido-alcohol resistencia (AAR), se pueden visualizar utilizando distintos procedimientos. Los métodos clásicos de tinción son el Ziehl-Neelsen y Kinyoun, que utilizan la fucsina fenicada como colorante primario, y en donde los microorganismos se tiñen de rojo sobre un fondo azul o verde, dependiendo del contracolorante utilizado (Figura 2a) (Palomino et al., 2007). Otro método ampliamente usado es la tinción fluorescente Auramina-Rodamina, aunque tiene el inconveniente de requerir un microscopio con fluorescencia para la visualización de los bacilos, no siempre disponible. En esta técnica, los bacilos, al observarlos con luz ultravioleta, aparecen fluorescentes de color amarillo o naranja dependiendo del filtro empleado (Figura 2b) (Alcaide Fernández de Vega et al., 2005). En toda baciloscopia en la que se observen bacilos hay que indicar además el número de bacilos por campo y el método de tinción empleado (Tabla 1). Estos datos serán valorados por el clínico según el contexto clínico y el tipo de muestra, ya que la sensibilidad de la técnica es mayor en las de origen respiratorio. En cuanto a las muestras extrapulmonares, el rendimiento de la microscopía es elevado en las obtenidas por biopsia o exéresis de tejidos (70–80%) y manifiestamente bajo en líquidos biológicos (5–20%) (Gonzalez-Martin et al., 2010). Es una técnica rápida y barata, ampliamente usada en países no desarrollados y útil para

proporcionar al clínico un diagnóstico preliminar. Su principal inconveniente es que no distingue bacterias viables de las no viables, además de no diferenciar la especie. Por otro lado, no hay que olvidar que existen otras bacterias (*Nocardia*, *Rhodococcus*, *Tsukamurella*, *Gordona*, *Legionella micdadei*) o formas parasitarias (ooquistes de *Cryptosporidium*, *Isospora*, *Sarcocystis* y *Cyclospora*) que pueden presentar diferentes grados de AAR (Alcaide Fernández de Vega et al., 2005).

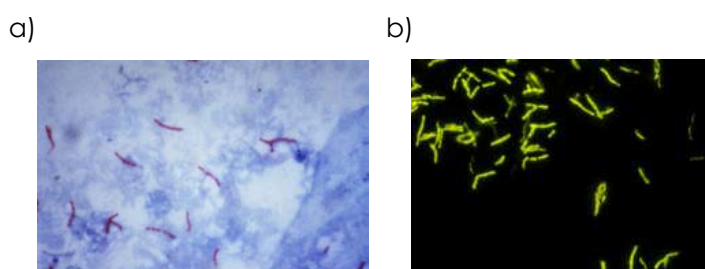


Figura 2. Baciloscopia positiva de *M. tuberculosis*. a) Tinción de Ziehl-Neelsen. b) Tinción fluorescente Auramina-Rodamina.

Informe	Tipo de tinción, aumento óptico y nº de bacilos AAR observados		
	Fucsina (1000x)	Fluorocromo (250x)	Fluorocromo (450x)
No bacilos AAR	0	0	0
Dudoso (repetir)	1-2/ 300 campos (3 barridos)	1-2/ 30 campos (1 barrido)	1-2/ 70 campos (1,5 barridos)
Positivo 1+	1-9/ 100 campos (1 barrido)	1-9/ 10 campos	2-18/ 50 campos (1 barrido)
Positivo 2+	1-9/ 10 campos	1-9/ 1 campo	4-36/ 10 campos
Positivo 3+	1-9/ 1 campo	10-90/ 1 campo	4-36/ 1 campo
Positivo 4+	>9/ 1 campo	>90/ 1 campo	>36/ 1 campo

Tabla 1. Interpretación de los resultados de la baciloscopia (Alcaide Fernández de Vega et al., 2005).

- *Cultivo bacteriológico*: la obtención de un cultivo positivo confirma el diagnóstico de la enfermedad y permite realizar estudios de sensibilidad antibiótica y de caracterización molecular de las cepas. El cultivo clásico se realiza en medios sólidos como el 7H10 y 7H11 de Middlebrook. El medio más utilizado es el Löwenstein-Jensen, basado en huevo, donde el crecimiento de la micobacteria se prolonga hasta 2-4 semanas (Figura 3), teniendo que esperar hasta 8 semanas para poder considerar el cultivo como negativo. Con el objetivo de aumentar la sensibilidad y disminuir el tiempo de obtención de resultados, se han desarrollado distintos medios líquidos enriquecidos como el 7H9 de Middlebrook, Youmans, Dubos, etc. Además, en los últimos años se han generado métodos comerciales de detección automática de crecimiento bacteriano, que miden, bien el consumo de oxígeno mediante fluorescencia (BACTEC MGIT 960), o bien la producción de dióxido de carbono mediante colorimetría (BacT/ALERT 3D), permitiendo obtener resultados positivos en una o dos semanas (Parrish et al., 2009). Una

vez obtenido el cultivo es posible abordar el estudio de sensibilidad antibiótica. El método clásico de detección de resistencias es el de las proporciones de Canetti, Rist y Grosset (1963). Este es un método fenotípico en el que se mide el crecimiento micobacteriano en medio sólido con concentraciones estandarizadas de los fármacos de primera y segunda línea. Una cepa será resistente cuando exista crecimiento, en presencia del fármaco, equivalente al menos a un 1% del observado en el control (Woods, 2000). Su mayor inconveniente es la demora en la obtención del resultado, que puede alargarse hasta 90 días si se considera, además del tiempo de realización del antibiograma, el tiempo de cultivo de MTB. Los métodos de detección de resistencias basados en cultivo líquido permiten acortar este tiempo de obtención de resultados ya que permiten realizar, simultáneamente con el cultivo de MTB, el estudio de resistencias frente a los dos fármacos más utilizado en el tratamiento de la TB (rifampicina e isoniazida).



Figura 3. Crecimiento de *M. tuberculosis* en Löwenstein-Jensen

- *Identificación molecular*: el diagnóstico molecular tiene la principal ventaja de no requerir el cultivo para la identificación de MTB, además de ser rápido, más sensible que la baciloscopia y tener una buena relación coste-beneficio. La principal desventaja es que, al igual que la baciloscopia, la mayor parte de los ensayos implementados no discrimina entre bacterias viables y no viables. Existen dos tipos de ensayos en función de que estén basados en sondas de hibridación o en PCR. El primer tipo de ensayo consiste en inmovilizar sondas de ADN específicas del MTBC sobre un soporte de nitrocelulosa y, tras la hibridación con la muestra problema, realizar un revelado enzimático. Las técnicas basadas en PCR realizan una amplificación de ADN (gen *hsp65*, subunidad ribosómica 16s, región intergénica 16s-23s ribosomal, elementos de inserción, etc.) seguida de la caracterización de los fragmentos de amplificación mediante restricción, hibridación o secuenciación (Alcaide Fernández de Vega et al., 2005). Actualmente, existen kits comerciales que, además de la identificación, pueden dar un resultado de sensibilidad a



fármacos mediante el estudio de mutaciones de resistencia. Uno de los más usados es Genotype MTBDRplus®, el cual detecta la resistencia frente a rifampicina e isoniazida (Drobniewski et al., 2015). Se basa en la amplificación mediante PCR multiplex de los genes de resistencia micobacterianos *rpoB*, *katG* e *inhA*, seguido de hibridación reversa en una tira de nitrocelulosa que contiene regiones parciales de estos genes fijados sobre ella (Figura 4) (WHO, 2008). Siguiendo el mismo principio, INNO-LiPA Rif TB® amplifica el gen *rpoB* por lo que detecta la resistencia a rifampicina (WHO, 2008). En los últimos años se ha extendido el uso de Xpert® MTB/RIF, tras la recomendación de la OMS dirigida especialmente a pacientes con sospecha de TB multirresistente (MDR) o asociada al VIH (WHO, 2014a). Este sistema, basado en la amplificación automatizada y en tiempo real del ADN, detecta simultáneamente la presencia de MTB y la resistencia a rifampicina, directamente de esputo, en menos de dos horas.

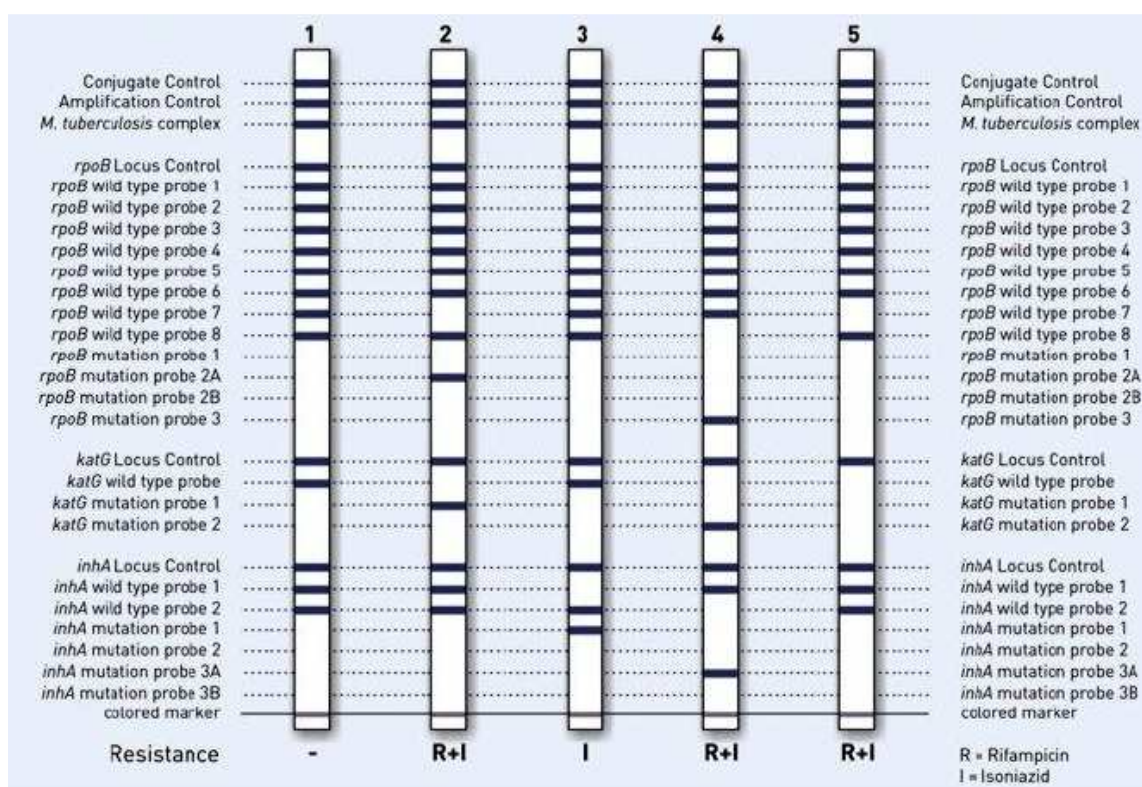


Figura 4. Identificación del MTBC y de resistencia a rifampicina e isoniazida de cinco cepas mediante el uso de Genotype MTBDRplus®.

### 2.3. Tratamiento

Actualmente hay 10 fármacos aprobados por la FDA (Food and Drug Administration) para el tratamiento de la TB, siendo cuatro los más utilizados: isoniazida (INH), rifampicina (RIF), pirazinamida (PZA) y etambutol (EMB).

### 2.3.1. Tratamiento de la tuberculosis sensible

Los fármacos utilizados en pacientes que presentan una TB sensible son los conocidos como de primera línea. El tratamiento en adultos y niños tiene una duración normalmente de 6-9 meses y consta de dos fases. En una primera fase inicial se administran 3 ó 4 fármacos durante 2 meses. En la segunda fase (de consolidación o continuación), normalmente de 4 meses de duración, se administran dos fármacos, generalmente INH y RIF, puesto que son sobre los que descansa la mayor eficacia del tratamiento (Aidar et al., 2010; 2003; Gonzalez-Martin et al., 2010).

### 2.3.2. Tratamiento de la tuberculosis resistente

Según la resistencia a unos u otros fármacos se consideran cuatro tipos de TB:

-TB monorresistente: resistencia a un solo fármaco.

-TB polirresistente: resistencia a dos o más fármacos, sin incluir simultáneamente INH y RIF.

-TB multirresistente (MDR): resistencia simultánea al menos a INH y RIF.

-TB extensivamente resistente (XDR): resistencia a INH, RIF y a por lo menos una fluoroquinolona y a un inyectable de segunda línea.

El tratamiento de la TB resistente resulta más complejo, pero hay que tener en cuenta que siempre se deben emplear al menos 3-4 fármacos eficaces y que se debe seguir con el tratamiento hasta 6 meses después de la negativización de los cultivos (Aidar et al., 2010). Por otra parte, los fármacos de segunda línea son, en general, menos eficaces, lo que puede plantear serios problemas de tratamiento en los pacientes con intolerancia grave o resistencia a más de un fármaco. Las pautas propuestas se basan a menudo en la experiencia y en recomendaciones de expertos, ya que no se dispone de suficientes estudios aleatorizados que establezcan cuales son las más adecuadas.

En pacientes con TB resistente a INH se debe sustituir este fármaco por EMB y prolongar el tratamiento hasta un total de 12 meses (segunda fase de 10 meses con RIF y EMB). En los casos de resistencia a RIF se debe sustituir éste por EMB y mantener el tratamiento durante 18 meses (segunda fase de 16 meses con INH y EMB). En los pacientes con TB resistente a PZA la pauta de tratamiento de 9 meses de duración (2 meses con INH, RIF y EMB, más 7 meses con INH y RIF) ha dado buenos resultados (Gonzalez-Martin et al., 2010).

El tratamiento de pacientes con TB MDR o XDR es complicado y, en la medida de lo posible, es muy importante que sea individualizado y guiado por antibiograma. El tratamiento debe incluir un mínimo de 4 fármacos potencialmente activos, incluyendo, siempre que sea posible, los que sean de primera línea, un inyectable de segunda línea (kanamicina, amikacina, capreomicina), y una quinolona (levofloxacin, moxifloxacin, gatifloxacin). En cuanto a la duración del tratamiento, la fase inicial, que debe incluir un fármaco inyectable, debe mantenerse un mínimo de 6 meses (o al menos 4 meses desde la negativización del cultivo), y la fase de continuación (sin inyectable) durará un mínimo de 18 meses desde la negativización del cultivo (Navas Elorza y Moreno Guillen, 2010). Es importante que los pacientes sean tratados bajo observación directa para garantizar el cumplimiento.

#### 2.4. Situación actual de la infección por *Mycobacterium tuberculosis* en humanos

La TB es un problema sanitario de primera magnitud a nivel mundial ya que es la segunda causa mundial de mortalidad, después del SIDA, debido a un agente infeccioso. En 2013 la tasa de mortalidad se situó en 1,5 millones de personas (WHO, 2014a).

Se considera que un tercio de la población está infectada por este patógeno, aunque se estima que sólo un 10% de los casos tienen riesgo de desarrollar la enfermedad. Sin embargo, este riesgo se incrementa 26-31 veces en casos de coinfección con VIH (WHO, 2015).

A pesar de que la tasa mundial de nuevos casos se ha ido reduciendo, sigue siendo elevada, estimándose en 9 millones (WHO, 2014a). La mayor incidencia se localiza en Asia Sudoriental, África y Pacífico Occidental, donde se alcanzan tasas de 125-500 casos por 100.000 habitantes (Figura 5). En la Unión Europea, la tasa de incidencia se encuentra entre las más bajas del mundo, aunque los patrones epidemiológicos nacionales indican una marcada variabilidad entre los países.

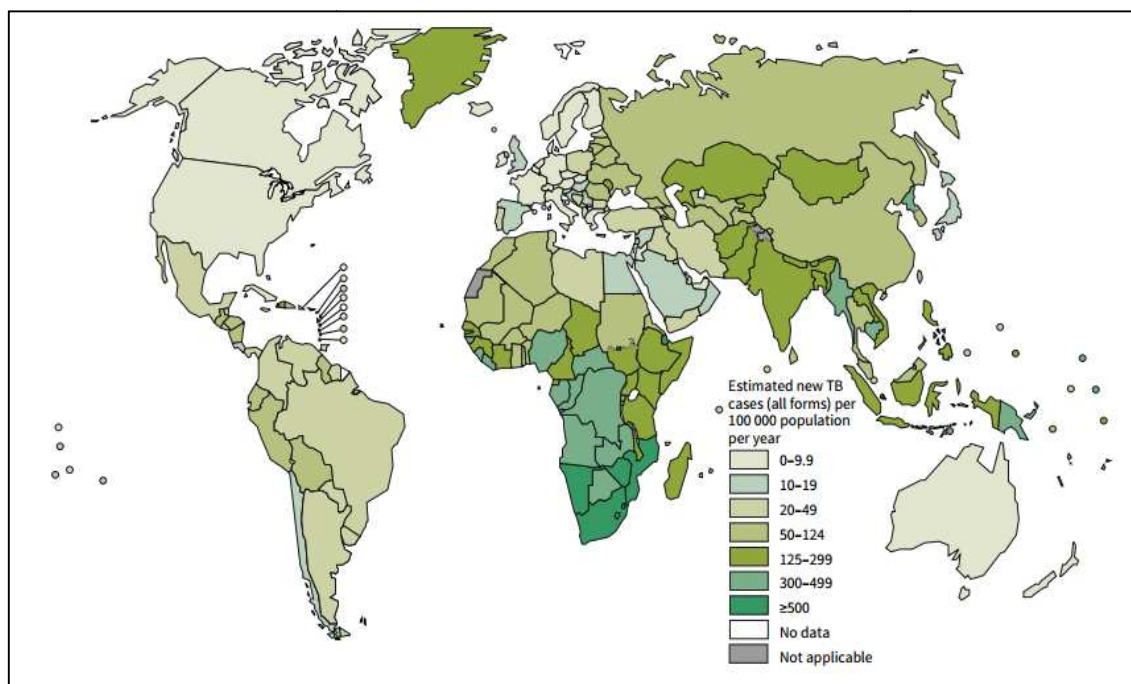


Figura 5. Tasas de incidencia estimadas, 2013(WHO, 2014a).

La incidencia en España es moderada. En 2012 se estimó en 13,04 casos por 100.000 habitantes (Rodríguez Valin y O, 2012). Durante el periodo 2006-2012, los casos de TB pulmonar han ido disminuyendo considerablemente, manteniéndose prácticamente constantes en otras localizaciones extrapulmonares (Figura 6a). Las comunidades autónomas con mayor incidencia son Ceuta y Galicia, donde supera los 24 casos/100.000 habitantes, seguidas de Cataluña, País Vasco y Castilla y León. En el extremo opuesto se encuentran Canarias, Castilla la Mancha y Extremadura, con incidencias menores a 9 casos/100.000 habitantes. La incidencia en adultos ha descendido de forma considerable durante los últimos años, con la excepción de un ligero aumento en 2008, mientras que en niños menores de 15 años se han producido oscilaciones, y es en el año 2012 cuando se observa por primera vez un claro descenso (5,4 casos/100.000) (Figura 6b). En menores de 5 años, la tasa de incidencia es casi el doble que en el total de la población infantil (8,4 casos/100.000).

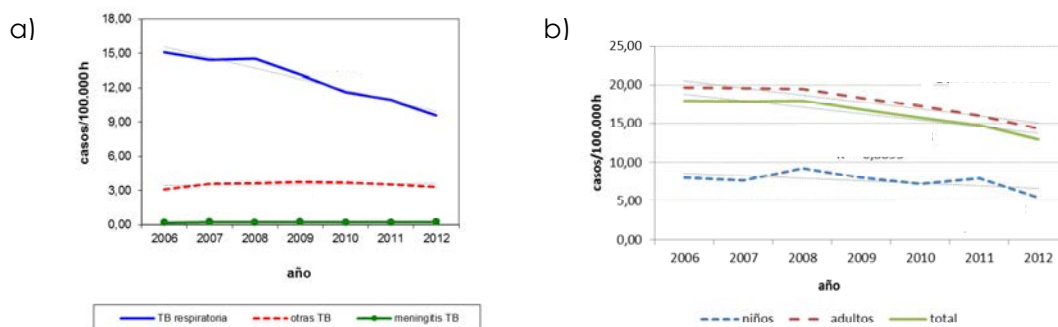


Figura 6. Tasas de tuberculosis en España, 2006-2012. a) Tasas por tipo de TB. b) Evolución de las tasas en niños (<15 años) y adultos (Rodríguez Valin y O, 2012).

Un aspecto importante en la incidencia de la TB es la aportación de casos procedentes de otros países. En 2012, del total de casos declarados, un 31,2% correspondían a inmigrantes. En el 53% de éstos, se dispuso de información sobre el país de nacimiento, siendo Marruecos, Rumania, Pakistán y Bolivia los países con mayor porcentaje de importación de casos. El porcentaje de casos extranjeros respecto al total de casos de TB varía mucho entre las Comunidades Autónomas. La Rioja (49%), Murcia (47%), Cataluña (46%) y Madrid (46%) son las que presentan una mayor proporción de casos inmigrantes, mientras que Extremadura y Galicia son las de menor porcentaje (1 y 7% respectivamente) (Rodríguez Valin y O, 2012).

La aparición de resistencias a fármacos es un aspecto de fundamental importancia. Concretamente preocupa la aparición y el aumento de casos de TB MDR y XDR. En 2013, a nivel mundial, se detectó que el 3,6% de los nuevos casos de TB y el 20% de los tratados de TB con anterioridad presentaban TB-MDR. En Europa Oriental y Asia Central se encuentran los mayores niveles de multirresistencia (Figura 7), donde hay países en los que más del 20% de los nuevos casos y más del 50% de los casos tratados con anterioridad tienen TB-MDR (WHO, 2014b). Por otro lado, se estima que un 9% de los casos que son TB-MDR pueden ser en realidad TB-XDR infradetectados (WHO, 2014c). En España, en el año 2012, el Centro Nacional de Microbiología (CNM) reportó un 4,25% de cepas multirresistentes, y sólo un caso fue causado por una cepa XDR (0,1%) (Rodríguez Valin y O, 2012).

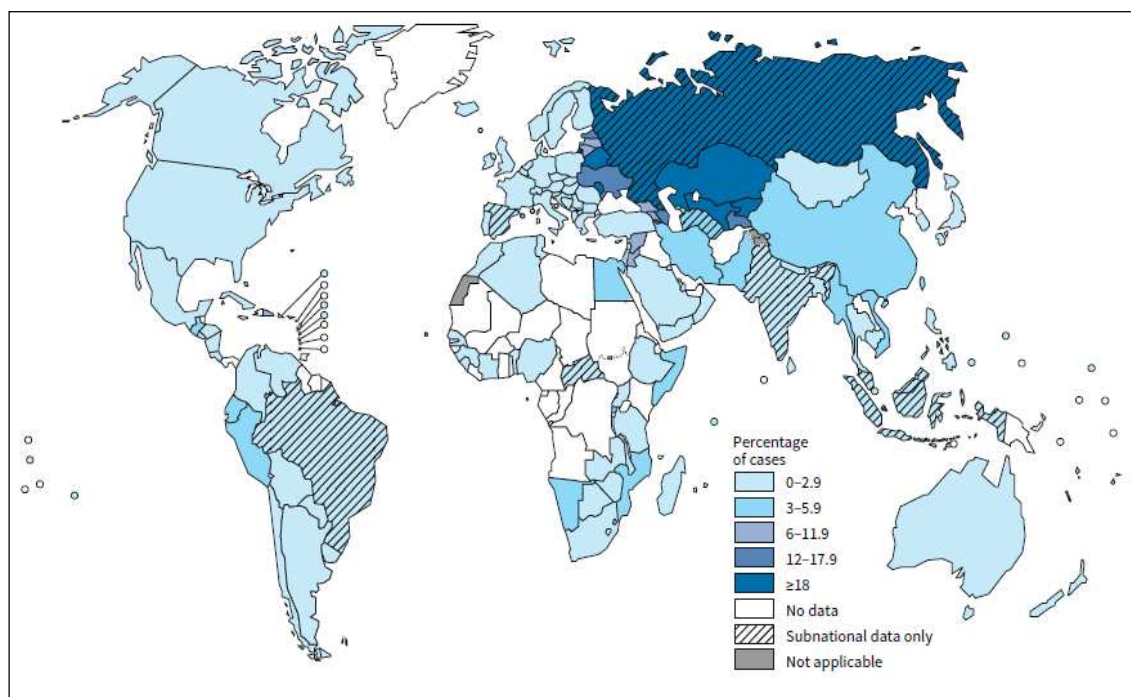


Figura 7. Porcentaje de nuevos casos de tuberculosis multirresistente, 2013 (WHO, 2014a)

## 2.5. Zooantroponosis

Además de ser el agente causal de la TB humana, MTB también se ha descrito como causante de TB en distintos animales. Esto es debido principalmente al contacto estrecho entre personas infectadas y animales. Así, se han descrito casos en multitud de especies como primates no humanos, ganado bovino, elefantes, rinocerontes, focas, pájaros, conejos, perros, gatos, cobayas, etc. (Vogelnest et al., 2015).

La susceptibilidad a la infección varía significativamente entre las distintas especies animales. Los monos del viejo mundo, como el macaco rhesus y el macaco de cola de cerdo, son las especies más susceptibles (Ghodbane y Drancourt, 2013). Otros animales altamente susceptibles a la enfermedad son los elefantes, los hámsteres y las cobayas. También hay animales moderadamente susceptibles como los cánidos, las focas, los tapires, los rinocerontes, los cerdos, las ratas y los ratones; y animales poco susceptibles a la enfermedad entre los que se encuentra el ganado bovino, felinos, equinos, ungulados, conejos, aves y reptiles (Vogelnest et al., 2015). La causa de la zoonosis se debe al contacto estrecho de los animales con personas con TB activa por MTB (Ameni et al., 2011).

Se estima que la prevalencia de casos de TB por MTB en el ganado bovino en África y Asia oscila entre el 4,7 y el 30,8%, mientras que en Europa solo 5 países han descrito casos (Ghodbane y Drancourt, 2013). Sin embargo, es posible que la aplicación

extensiva de los métodos moleculares revele casos hasta ahora infradetectados. Así, en Eslovenia, mediante la técnica molecular RFLP-IS6110, se demostró por primera vez un caso de transmisión desde un granjero que había tenido TB pulmonar a un animal (Ocepek et al., 2005). Recientemente en España se han descrito tres casos de transmisión humano-animal confirmados por epidemiología convencional y molecular (Romero et al., 2011).



### 3. Tuberculosis causada por *Mycobacterium bovis*

*Mycobacterium bovis* (*M. bovis*) es el agente causal más frecuentemente asociado a la TB en animales. Su hospedador principal son los bovinos, aunque también se han descrito casos en otras especies. De la misma manera, la TB en bovinos puede estar causada por otros miembros del MTBC, entre los que cabe destacar los causados por *M. caprae*. Sin embargo estos casos son minoritarios (Rodríguez et al., 2011). Por este motivo, en este capítulo nos centraremos en la descripción de casos de tuberculosis bovina causada por *M. bovis* (TBb).

#### 3.1. Patogenia

La vía principal de contagio es la aerógena (Menzies y Neill, 2000), aunque también se han descrito casos en los que la vía oral ha sido la causante de enfermedad, debido a la ingestión de material contaminado (Goodchild y Clifton-Hadley, 2001), como es el caso de leche contaminada, en el caso de los terneros, o de pastos. Cuando la vía de transmisión es la inhalación de aerosoles que contienen *M. bovis*, la infección primaria ocurre en el pulmón. En caso de contagio oral, la localización del foco primario es extrapulmonar.

Una vez que se produce la entrada en el organismo de los bacilos, éstos son fagocitados por los macrófagos, en los que *M. bovis* es capaz de persistir y replicarse (Liebana et al., 2000) y, posteriormente, tras la estimulación de la inmunidad innata y adquirida, se forma el granuloma característico de la enfermedad. A medida que la enfermedad progresa, los granulomas maduran y sufren una necrosis caseosa central, a menudo acompañado por calcificación. La infección puede propagarse del foco primario directamente, por contigüidad, vía linfática o diseminación hematológica (EFSA, 2003). Así, aunque las lesiones de la TBb se pueden encontrar en diferentes órganos, las localizaciones predominantes corresponden al tracto respiratorio superior e inferior y a los linfonodos de drenaje (Francis, 1958; Neill et al., 1991; Pritchard, 1988; Stamp, 1948). Alternativamente, tal y como ocurre en la TB humana, la bacteria puede permanecer en estado latente en el huésped sin desencadenar la enfermedad.

Dado que la enfermedad es de evolución lenta, un solo ejemplar puede transmitir la enfermedad a otros animales antes de manifestar los primeros signos clínicos. De ahí que las principales vías de transmisión sean el contacto estrecho con animales infectados, el movimiento de animales infectados que no respondan a las pruebas diagnósticas y el contacto con animales salvajes infectados (OIE, 2015).



## 3.2. Diagnóstico

### 3.2.1 Diagnóstico clínico de la tuberculosis

Los signos clínicos en los bovinos infectados por *M. bovis* son principalmente respiratorios pero inespecíficos, de hecho, algunos animales con lesiones tuberculosas miliares pueden ser clínicamente normales. Los animales pueden presentar emaciación progresiva, debilidad, pérdida de peso, apetito caprichoso o pérdida del mismo, fiebre fluctuante, diarrea, cambios en el pelaje y linfonodos hipertrofiados (2003). Sin embargo actualmente, en países con programas de erradicación, es difícil la observación de sintomatología clínica.

### 3.2.2. Diagnóstico inmunológico

La prueba de la intradermotuberculinización (IDTB) se basa en una respuesta inmune de hipersensibilidad retardada de tipo IV, y constituye el método oficial de diagnóstico de la TBb. Consiste en medir la reacción local que se produce a las 72 horas de la administración intradérmica del derivado proteico purificado de *M. bovis* (PPD bovina). El lugar de la administración es la parte anterior del cuello, aunque también puede realizarse en el pliegue caudal de la cola. Se considera una reacción positiva si hay una induración mayor o igual a 4mm (Directiva Europea 64/432/EEC, modificada por ED 1226/2002 del 8 de julio 2002) (EFSA, 2003).

Existen distintas interpretaciones dependiendo de la prevalencia pero en caso de exposición ambiental a otras micobacterias, es necesario diferenciar entre animales infectados con *M. bovis* y animales sensibilizados debido a una exposición a otras micobacterias. En estos casos, se realiza la prueba comparativa de la tuberculina intradérmica con tuberculina bovina (PPD bovina) y aviar (PPD aviar) (Bezós et al., 2014; EFSA, 2003). En este caso, la reacción se suele considerar positiva si existe un aumento del grosor de la piel, en el punto de inoculación de la PPD bovina, 4mm superior a la reacción observada en el punto de inoculación de la PPD aviar.

Además, como prueba oficial complementaria a la IDTB, existe un método inmunológico basado en la detección de IFN- $\gamma$  (Rothel et al., 1990). Consiste en medir, a partir de sangre completa, la inmunidad celular mediante la cuantificación del IFN- $\gamma$  producido por linfocitos sensibilizados con los antígenos específicos (PPD bovina y aviar). Para mejorar la especificidad de la técnica, se han comenzado a utilizar los antígenos CFP-10 y ESAT-6, especialmente en poblaciones que resultan positivas a la prueba de la tuberculina (OIE, 2012; Vordermeier et al., 2014). Como ventajas frente a la prueba

intradérmica se encuentran la mayor sensibilidad de la técnica, la posibilidad de detectar animales en una fase de infección más temprana, la interpretación más objetiva de los resultados debido a la obtención de un valor cuantitativo, que permite definir puntos de corte. Sin embargo, su mayor limitación es su menor especificidad con respecto a la IDTB y que la interpretación de los resultados depende de la prevalencia de la infección en cada región, necesitando adaptar los puntos de corte para obtener un resultado preciso (Faye et al., 2011).

### 3.2.3. Diagnóstico anatomopatológico

Mediante la realización de la necropsia se pueden identificar las lesiones producidas por la diseminación del bacilo, por la linfa o la sangre, a diversos órganos. Las lesiones más frecuentes se localizan en los pulmones y los linfonodos asociados. Aunque cualquier lóbulo pulmonar se puede ver afectado, las lesiones se encuentran más frecuentemente en las regiones dorsocaudales de los lóbulos diafragmáticos, así como en las tonsilas y linfonodos retrofaríngeos (Cassidy et al., 1999).

### 3.2.4. Diagnóstico microbiológico

Para realizar el diagnóstico microbiológico de la TBb se necesita homogeneizar y descontaminar las muestras obtenidas de los linfonodos anormales y órganos parenquimatosos en los que se observan lesiones, tales como los pulmones, el hígado, el bazo, etc. En los casos en los que el animal no presenta lesiones patológicas se deben recoger muestras del hígado y de los siguientes linfonodos: retrofaríngeo, traqueobronquial, mediastínico, supramamario, mandibular y mesentérico (Directiva Europea 64/432/EEC, modificada por ED 1226/2002 del 8 de julio 2002).

- *Microscopía*: *M. bovis* puede observarse microscópicamente en frotis tanto de muestras clínicas como de muestras de tejido preparadas. La tinción frecuentemente utilizada es la clásica de Ziehl-Neelsen, pero, de la misma manera que ocurre con MTB, también puede utilizarse una tinción fluorescente de auramina (EFSA, 2003). Sin embargo, el diagnóstico microscópico es un diagnóstico presuntivo.

- *Cultivo bacteriológico*: el diagnóstico de confirmación de la enfermedad requiere el cultivo de *M. bovis*. Éste se realiza tradicionalmente en medios sólidos basados en huevo, como el de Löwenstein-Jensen, Coletsos o Stonebrink, los cuales deben contener piruvato (EFSA, 2003). Los cultivos se incuban a 37°C durante 8-12 semanas, considerándose como negativos si no se detecta crecimiento pasadas 12 semanas (OIE,

2012). También es posible, al igual que en MTB, el cultivo en el medio líquido automatizado BACTEC MGIT 960.

- *Identificación molecular*: la aplicación de PCRs específicas permite la identificación de *M. bovis*. Algunos diseños de PCR se dirigen a la identificación de mutaciones específicas marcadoras de *M. bovis*, como las que se encuentran en los genes *oxyR*, *pncA*, *gyrB*, o bien a la detección de la ausencia de RDs (OIE, 2012).

### 3.3. Situación actual de la infección por *M. bovis* en animales

La importancia de la TBb radica en su repercusión en salud pública debido al carácter zoonótico de la enfermedad. La prevalencia más elevada se registra en la mayor parte de África, América del Sur y ciertas partes de Asia. Desde los años 20, se han aplicado distintas estrategias de erradicación de la enfermedad que han resultado en una disminución de la prevalencia. Sin embargo esta reducción es heterogénea en los distintos países. Una de las posibles causas es la presencia de reservorios salvajes, que constituyen una fuente de reinfección, como son la zarigüeya australiana (*Trichosurus vulpecula*) en Nueva Zelanda, el tejón europeo (*Meles meles*) en Gran Bretaña e Irlanda, el búfalo africano (*Syncerus caffer*) en Sudáfrica, el jabalí (*Sus scrofa*) en la Península Ibérica y el ciervo de cola blanca (*Odocoileus virginianus*) en Michigan (Estados Unidos de América) (Palmer, 2013).

Las estrategias de control de la TBb persiguen el reconocimiento por parte de la OMS de zona, o país, libre de TBb (*Oficial Tuberculosis Free*, OTF). Para ello, dicha zona o país deberá haber demostrado que al menos el 99,8% de los rebaños y el 99,9% de los bovinos, búfalos y bisontes del país o la zona están libres de TBb. Para que la enfermedad se considere erradicada, esta situación debe prolongarse durante 6 años consecutivos (OIE, 2011). De acuerdo con estos criterios, la TBb se encuentra prácticamente erradicada en la mayoría de los países de la Unión Europea, en donde el porcentaje de los rebaños infectados por *M. bovis* es bajo (0,68%) (Figura 8), encontrándose tanto países OTF como no OTF, como es el caso de Reino Unido con una prevalencia de 12,1%.



Figura 8. Proporción de rebaños infectados por *Mycobacterium bovis* en 2013. \*Proporción de las regiones no OTF (EFSA)

España es un país no libre de TB. En 2013 la prevalencia de rebaño se estimó en un 1.39%. Sin embargo hay que destacar que tanto la prevalencia de rebaño como la incidencia en animales, ha ido descendiendo moderadamente desde los años 80 gracias a los programas de erradicación nacionales (Figura 9).

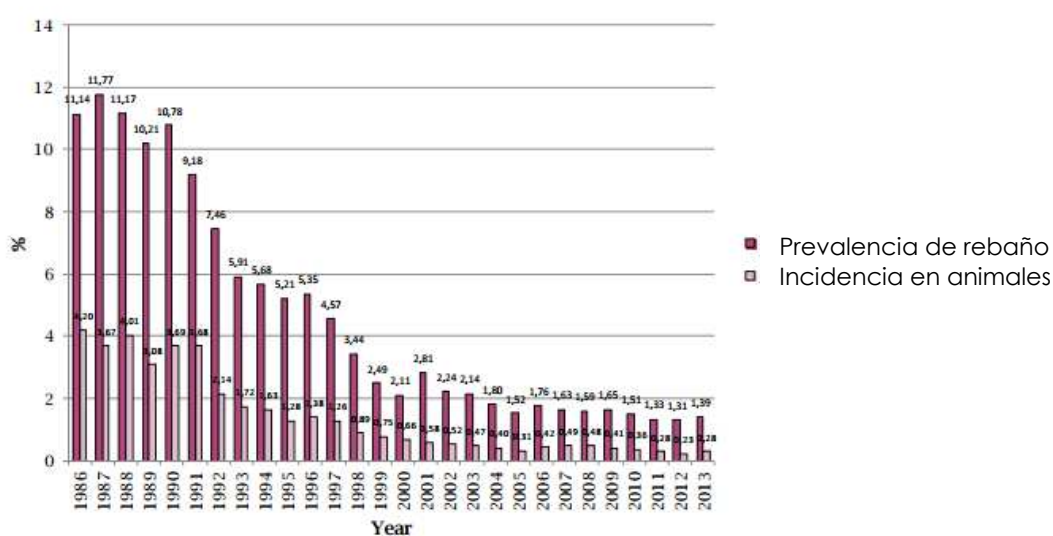


Figura 9. Prevalencia de rebaño e incidencia en animales de tuberculosis bovina. Periodo 1986-2013 (Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente)

### 3.4. Antropozoonosis

La transmisión de *M. bovis* al hombre puede ser directa, a través de la exposición a animales infectados, o indirecta, a través del consumo de productos animales contaminados. El contagio directo por los animales conduce a la TB pulmonar. Los factores de riesgo para desarrollar la enfermedad, además de los clásicos para la TB humana (carga bacilar expectorada, tiempo total de exposición, tamaño de la gota, persistencia de aerosoles y estado inmune), son la proximidad a un animal infectado y la participación en prácticas o procedimientos veterinarios que generen aerosoles (lavados respiratorios, necropsias, etc.). La transmisión indirecta se produce por la ingestión de productos contaminados como la leche cruda o derivados lácteos no pasteurizados (Dankner et al., 1993; LoBue et al., 2003) y conduce a una TB extrapulmonar.

De los pacientes expuestos a *M. bovis*, al igual que ocurre con MTB, solo unos pocos desarrollarán la enfermedad generalmente como resultado de una reactivación asociada a la inmunosupresión del paciente. Por otro lado, la transmisión entre humanos es infrecuente y queda restringida a casos inmunodeprimidos o a circunstancias de vinculación muy estrecha y alta exposición (Sunder et al., 2009).

En Europa esta infección es poco común, habiéndose notificado en 2013 únicamente 134 casos en toda la UE. La mayoría de los casos se registraron en Irlanda, Alemania, Reino Unido y España (EFSA y ECDC, 2015). Sin embargo, antes de la implantación de los programas de erradicación y de los controles en matadero de la leche por tratamiento térmico, la prevalencia era del 30% (O'Reilly y Daborn, 1995). Fuera de la UE, los países con mayor prevalencia son México, Uganda y Nigeria, con valores que oscilan del 5 al 13,8% (Perez-Lago et al., 2014b). Estas cifras pueden estar infraestimadas debido a que la enfermedad es clínica, radiológica e histopatológicamente indistinguible de la causada por MTB.

## 4. Genotipado de tuberculosis

En los últimos 20 años se han venido desarrollando distintas técnicas moleculares que han revolucionado el estudio de la TB. Estas técnicas, mediante el estudio de distintas regiones genómicas de las micobacterias, son capaces de desvelar el genotipo de la cepa, es decir, de generar un patrón genético específico de cada una de ellas. A continuación se detallarán las herramientas de genotipado más utilizadas así como sus aplicaciones en diferentes contextos.

### 4.1. Herramientas moleculares de tipado

#### 4.1.1. RFLP-IS6110

El método molecular de referencia de genotipado de MTB ha sido, hasta hace escasos años, el *RFLP-IS6110* (*Restriction Fragment Length Polymorphism*) (Kremer et al., 1999; Small et al., 1994). Este método establece las diferencias entre cepas basándose en el número de copias de la secuencia de inserción 6110 (IS6110), y en su localización en el cromosoma. Para visualizar el patrón de bandas IS6110, el ADN ha de extraerse y purificarse a partir del cultivo. A continuación, se digiere con la enzima de restricción *PvuII* y los fragmentos de restricción obtenidos se separan en un gel de agarosa. Posteriormente, estos fragmentos se transfieren a una membrana de nylon (*Southern blotting*). Para revelar los fragmentos que contienen la IS6110, éstos se hibridan con una sonda complementaria a la secuencia de inserción, marcada con peroxidasa, y así, mediante una reacción de quimioluminiscencia, se obtiene el patrón de bandas específico de cada cepa (Figura 10).

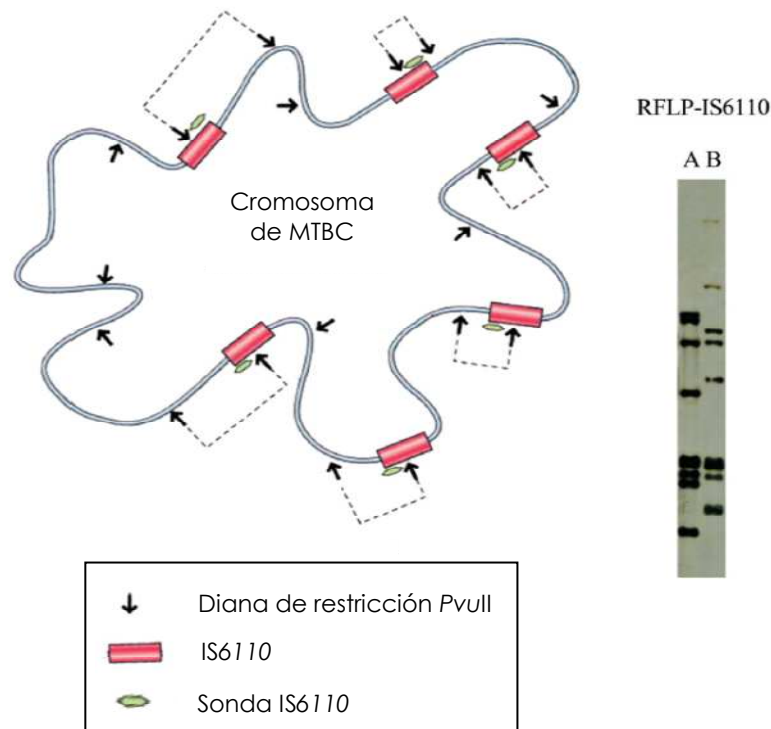


Figura 10. Representación del cromosoma del MTBC con las IS6110, dianas de restricción PvuII y las sondas IS6110 y ejemplos de 2 patrones de cepas A y B (Ramos et al., 2014).

Uno de los principales inconvenientes que presenta esta técnica es que no muestra suficiente capacidad de discriminación en aquellas cepas que contienen un número bajo de copias de la IS6110 (van Soolingen et al., 1993). Esto es especialmente limitante en cepas de *M. bovis*, ya que la mayoría de ellas presentan menos de 5 copias de esta secuencia (Aranaz et al., 1999; Kremer et al., 1999). Como limitaciones adicionales hay que mencionar que esta técnica requiere gran cantidad de ADN purificado en condiciones de alta calidad, lo que exige disponer de cepas viables, y obliga a que el tiempo de obtención del genotipo se prolongue considerablemente, ya que se requieren cultivos masivamente crecidos. Por último, la comparación entre cepas precisa de la utilización de un programa específico de análisis, requiriendo para la comparación interlaboratorio de un fuerte proceso de estandarización.

Todas las limitaciones mencionadas han conducido al desarrollo de otras técnicas de genotipado más sencillas y rápidas, que faciliten la comparación entre las cepas de MTB circulantes.

## 4.1.2. MIRU-VNTR

En el genoma de MTBC se localizan secuencias repetidas en tándem que presentan variabilidad alélica relacionada con el número de repeticiones. Algunas de ellas reciben el sobrenombre de MIRU (*Mycobacterial Interspersed Repetitive Units*), si bien otras son denominadas ETR (*Exact Tandem Repeats*) o QUB (*Queen's University Belfast*) (Figura 11a). La técnica MIRU-VNTR consiste en analizar el número de repeticiones en tándem de estos loci. Para ello se realiza una amplificación usando cebadores específicos para las regiones flanqueantes de los loci, y se determina el tamaño de los productos de amplificación tras la migración electroforética de éstos (Figuras 11a y b). A partir de la longitud conocida de las unidades de repetición (entre 40-100 pares de bases), el tamaño del amplicón obtenido permite calcular el número de copias en el locus analizado. El resultado final es un código numérico (MIRUtipo) que indica el número de repeticiones en cada locus (Figura 11c), el cual facilita la comparación entre cepas tanto intra como interlaboratorio.

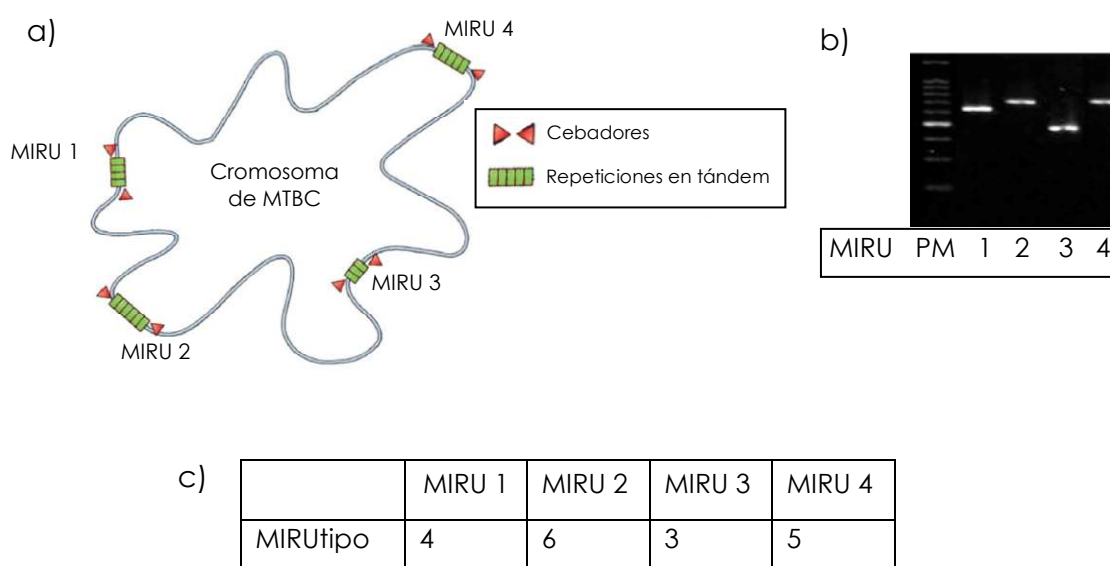


Figura 11. a) Representación esquemática de 4 loci localizados en cromosoma de una cepa del MTBC, junto con los cebadores utilizados en la técnica MIRU-VNTR. b) Gel de electroforesis de los productos de amplificación de las 4 PCRs. PM: marcador de peso molecular. c) MIRUtipo obtenido a partir de los 4 loci amplificados. (Ramos et al., 2014).

Tras el desarrollo de la técnica se ha procedido a la automatización de la misma. Se ha adaptado la realización de las PCRs a un formato de reacción multiplex, amplificando 3 loci simultáneamente, seguidos de una electroforesis capilar para la asignación automática del número de repeticiones. Este formato aumenta la sensibilidad



de la técnica así como simplifica y estandariza la obtención del MIRUtipo. Recientemente se han desarrollado kits comerciales que facilitan aún más la obtención del genotipo (de Beer et al., 2014; Supply et al., 2014).

El análisis MIRU-VNTR, al estar basado en PCR requiere poca cantidad de ADN. Esto ha posibilitado la realización del genotipado directamente sobre la muestra clínica del paciente, sin necesidad de cultivo, alcanzándose hasta un 98,4% de muestras completamente genotipadas (Alonso et al., 2012; Bidovec-Stojkovic et al., 2014).

Para el genotipado de MTB, inicialmente se utilizó un número reducido (12) de loci que demostraron no ser lo suficientemente discriminatorios. Posteriormente se han utilizado diferentes agrupaciones de loci (15 y 24) que han logrado aumentar la capacidad discriminatoria de la técnica (Supply et al., 2006; Supply et al., 2001; Supply et al., 2000). Esta técnica ha demostrado ser más discriminatoria que el RFLP, y actualmente el conjunto de 24 loci es utilizado como la nueva técnica de referencia para estudios epidemiológicos en MTB (de Beer et al., 2013; Jonsson et al., 2014; Supply et al., 2006; Vasconcellos et al., 2014).

En *M. bovis*, sin embargo, no existe consenso a nivel mundial sobre el número y la combinación de loci que ofrezcan una óptima discriminación (Bolado-Martinez et al., 2015; Hilty et al., 2005; Roring et al., 2004; Sun et al., 2012; Yang et al., 2015), aunque recientemente se ha propuesto un grupo de 6 loci que ofrece buenos resultados en cepas de diferentes orígenes geográficos (Supply, 2006).

#### 4.1.3. Espoligotipado

El espoligotipado es un método de genotipado de cepas de MTBC basado en PCR, que consiste en el análisis de los espaciadores, de 35 a 41 pares de bases, que se disponen en una región del cromosoma organizada en repeticiones directas (región DR) (Figura 12a). Este locus contiene un número variable tanto de DRs como de espaciadores entre las mismas de secuencia variable. A partir de la cepa H37Rv de MTB y de la cepa vacunal BCG, se han diseñado 43 oligonucleótidos complementarios a 43 de estos espaciadores, los cuales se disponen alineados sobre una membrana de nylon para facilitar su análisis.

Para la obtención del espoligotipo, la región DR de la cepa problema es amplificada mediante PCR. Para ello, se utilizan cebadores marcados con biotina complementarios a la secuencia DR y orientados inversamente (Figura 12b). De esta forma, se obtiene una colección de productos de amplificación de distintos tamaños

(Figura 12c) que son hibridados sobre la membrana en la que se encuentran inmovilizados los oligonucleótidos sintéticos. Por último, tras incubar la membrana hibridada con el conjugado estreptavidina-peroxidasa, mediante una reacción quimioluminiscente se obtiene el espoligotipo (Figura 12d).

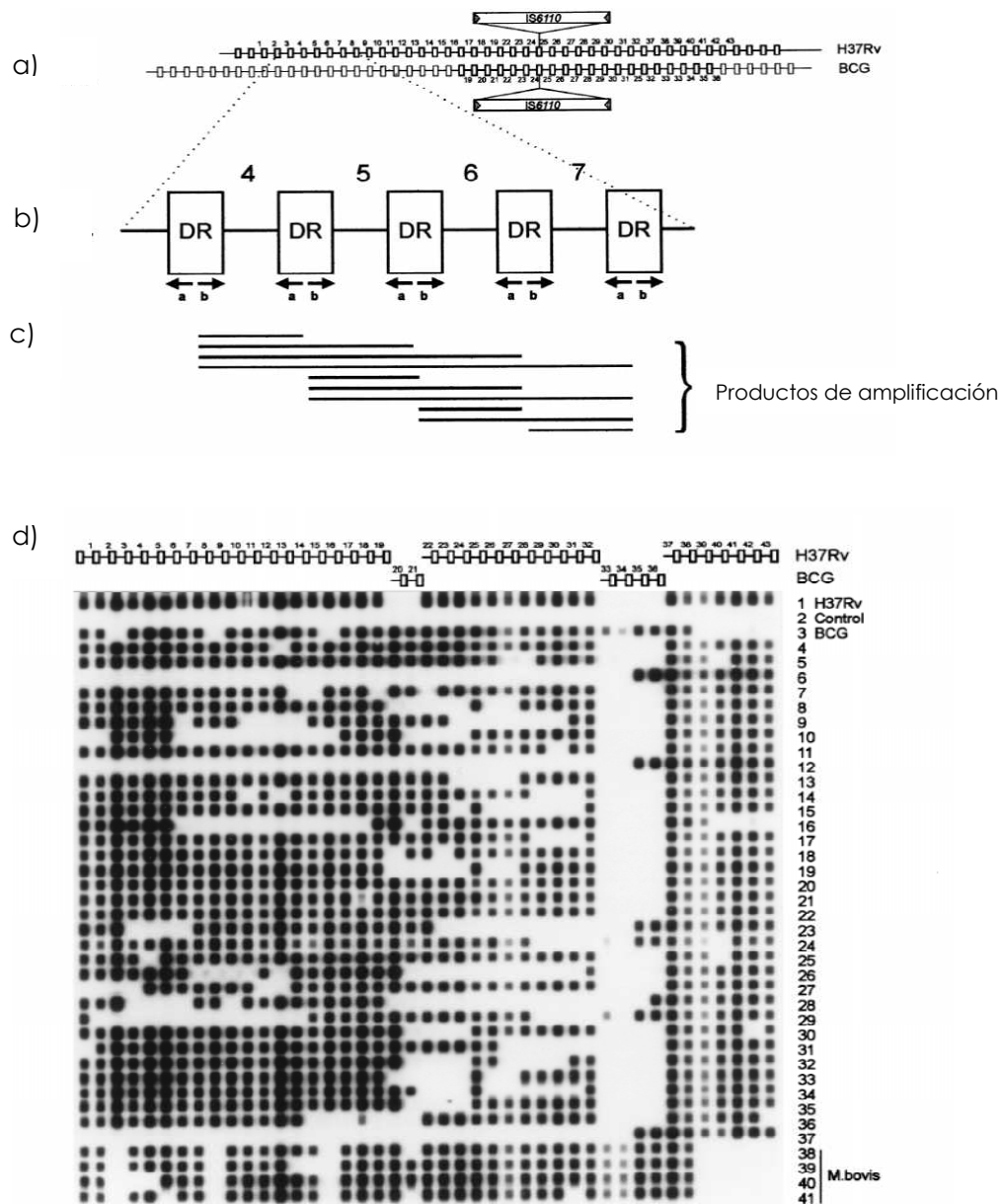


Figura 12. a) Estructura del locus DR en el genoma del MTBC. Las DRs, representadas en forma de rectángulos, están intercaladas con los distintos espaciadores. b) Principio de la amplificación de la región DR mediante PCR. c) Se muestra la colección de fragmentos de diferente tamaño que se producirían por amplificación de sólo cinco DRs contiguos. d) Ejemplo de membrana de espoligotipado hibridada con cepas de los controles H37Rv (línea 1), control (línea 2), BCG (línea 3), y 38 cepas del MTBC (líneas 4 a 41) (Kamerbeek et al., 1997).

El espoligotipado aplicado sobre aislados cultivados resulta una técnica simple, robusta, altamente reproducible y cuyos resultados son fácilmente comparables. Además, al contrario que el RFLP-IS6110, tiene la ventaja de requerir poca cantidad de ADN, y sin necesidad de que esté purificado. La capacidad de discriminación no es demasiado elevada, siendo frecuente que cepas de MTB con diferentes patrones de RFLP-IS6110 compartan un mismo espoligotipo, excepto cuando el número de copias de IS6110 es bajo (Aranaz et al., 1996; Goguet de la Salmoniere et al., 1997). De esta forma, su poder de discriminación para el tipado de *M. bovis* es mayor que el ofrecido por el RFLP-IS6110 (Bauer et al., 1999), por lo que el espoligotipado ha sido ampliamente utilizado en diversos estudios con este miembro del complejo (Ameni et al., 2010; Biffa et al., 2010; Gutierrez Reyes et al., 2012; Milian-Suazo et al., 2008). Adicionalmente, esta técnica permite identificar a *M. bovis* del resto de los miembros del MTBC, debido a la obtención de un patrón característico, determinado por la ausencia de hibridación de los últimos 5 espaciadores.

Para mejorar la capacidad discriminatoria de la técnica, y tras la descripción de la presencia de 51 nuevos espaciadores (van Embden et al., 2000), se evaluó la utilidad de aplicar el total de los 94 espaciadores. Tras realizar esta evaluación sobre 314 cepas del MTBC, se propuso la utilización de un nuevo panel de 40 espaciadores a circunstancias que exigen una mayor discriminación. cepas con bajo número de copias de IS6110 o cepas de la familia Beijing (van der Zanden et al., 2002).

#### 4.1.4. Secuenciación del genoma completo

Las técnicas de genotipado, aunque se dirigen a dianas genéticas especialmente polimórficas, interrogan a menos del 1% del genoma de MTBC, por lo que su capacidad discriminatoria está intrínsecamente restringida. La aplicación de la secuenciación del genoma completo (*Whole Genome Sequencing*, WGS), de reciente desarrollo, permite resolver esta limitación ya que proporciona la información genómica completa.

Los principales inconvenientes radican en la necesidad de disponer de gran cantidad de ADN de alta calidad, el alto coste de la técnica y la complejidad de los análisis bioinformáticos necesarios. Sin embargo, avances recientes alrededor de esta tecnología están disminuyendo los costes y los requerimientos del ADN, lo que permite prever su rápida expansión.

Por tanto, el análisis por WGS tiene el potencial para convertirse en la herramienta definitiva para el genotipado de cepas del MTBC (Kohl et al., 2014; Roetzer et al., 2013).

## 4.2. Aplicaciones del genotipado del complejo *Mycobacterium tuberculosis*

Las aplicaciones derivadas del genotipado de cepas del MTBC son numerosas. A continuación se detallarán las más representativas dentro del contexto diagnóstico y epidemiológico.

### 4.2.1. Estudio de contaminaciones cruzadas de laboratorio

Con anterioridad al desarrollo de las técnicas de biología molecular no se disponía de una herramienta definitiva de detección de la contaminación cruzada de laboratorio, la cual consiste en la transferencia accidental de bacilos de una muestra, generalmente con alta carga bacilar, a otra muestra procesada conjuntamente con ella. Se sospecha que un caso es un falso positivo por contaminación cruzada de laboratorio cuando se cumplen los siguientes requisitos:

- Las baciloscopias de las muestras son negativas y existe crecimiento a partir de una sola de las mismas.
- La muestra de la que se obtiene crecimiento se ha procesado conjuntamente con, al menos, una muestra auramina positiva de otro paciente.
- La evolución clínica del paciente es inconsistente con la tuberculosis.

En estos casos es necesario el genotipado de las cepas involucradas en el análisis de laboratorio. De esta forma, si el genotipo de la cepa correspondiente a la sospecha de falso positivo coincide con el de otra muestra procesada simultáneamente en el laboratorio, se puede concluir que se ha producido una contaminación cruzada. A partir de la introducción de las técnicas de genotipado se han realizado estudios que señalan que hasta un 4% de los cultivos de MTB corresponden a falsos positivos (Braden et al., 1997; de Boer et al., 2002). Debido a la rapidez en la obtención de resultados y a la gran discriminación de la técnica, MIRU-VNTR es la herramienta de elección para estudiar estos casos (Martin et al., 2008; Yang et al., 2015).

### 4.2.2. Estudio de recurrencias: reactivación vs reinfección

En la infección por MTB, una recurrencia hace referencia a la reaparición de los síntomas de TB tras un episodio previo que había sido considerado clínicamente curado. Tradicionalmente se asumía que las recurrencias eran producidas por la misma cepa que causó el primer episodio, es decir, correspondían a una reactivación endógena. Sin

embargo, tras la introducción de los métodos de genotipado, se ha observado que ciertas recurrencias, consideradas como reactivaciones, eran realmente reinfecciones exógenas producidas por una cepa diferente a la que causó el primer episodio (Bryant et al., 2013; Guerra-Assuncao et al., 2015). Hasta un 75% de las recurrencias producidas en zonas de alta incidencia son debidas a reinfecciones (Glynn et al., 2010; van Rie et al., 1999). Además, en zonas de baja incidencia, donde el fenómeno de recurrencia es menor, ésta también puede ser atribuible, aunque en menor medida, a la reinfección (Bandera et al., 2001; Jasmer et al., 2004). Aunque existe una asociación clara entre el paciente VIH positivo y la recurrencia, no se ha llegado a un resultado concluyente en cuanto a la posible asociación entre estado VIH y frecuencia de reinfección (Glynn et al., 2010; Guerra-Assuncao et al., 2015; Luzze et al., 2013; Narayanan et al., 2010).

La capacidad de discriminación de MIRU-VNTR, así como la rapidez en la obtención de resultados, la convierten en una estrategia idónea para el estudio de las recurrencias. Publicaciones recientes han aplicado WGS (Bryant et al., 2013; Guerra-Assuncao et al., 2015) para abordar este análisis, sin embargo, debido principalmente al elevado coste actual, no parece justificada su aplicación para este propósito.

#### 4.2.3. Epidemiología molecular

La epidemiología molecular ha supuesto un gran avance en el estudio de las dinámicas de transmisión del MTBC. La aplicación de las técnicas de genotipado permite identificar casos de transmisión reciente de TB en mayor proporción de la que la epidemiología convencional lo habría hecho. Tradicionalmente, el estudio de las cadenas de transmisión de TB descansa en el estudio de contactos, sin embargo, esta aproximación ha demostrado ser ineficaz para identificar rutas de transmisión que impliquen entornos diferentes al domiciliario y laboral. Las estrategias de biología molecular permiten optimizar estas carencias.

El genotipado de las cepas del MTBC puede desvelar dos situaciones diferentes:

1) *Casos infectados por una misma cepa*: los casos producidos por cepas con genotipo idéntico (*cluster*) son candidatos a pertenecer a una misma cadena de transmisión reciente de la infección. En estos casos, se deberá corroborar la existencia de vínculos epidemiológicos entre los casos.

2) *Casos infectados por cepas únicas*: los casos en los que el genotipo de la cepa no sea identificado en otro caso de la población (cepas huérfanas), son candidatos a

que su enfermedad se haya producido por la reactivación de infecciones latentes adquiridas en el pasado.

En el establecimiento de los casos en *cluster* o huérfanos en una población, es decisiva la duración del estudio poblacional (van Soolingen et al., 1999). Así, en estudios de corta duración es improbable identificar tanto el caso índice como los casos secundarios, por lo que se estarían infradetectando los casos de transmisión reciente.

Para el estudio de la transmisión de TB se han utilizado diferentes técnicas de genotipado. Inicialmente, la técnica de RFLP-IS6110 fue ampliamente usada para la realización de estudios poblacionales (Pfyffer et al., 1998; Small et al., 1994; van Soolingen et al., 1999) así como para el estudio de brotes (Edlin et al., 1992; van Deutekom et al., 1997; van Soolingen et al., 1999). La técnica de MIRU-VNTR ha demostrado ofrecer un alto poder discriminatorio, por lo que actualmente es utilizada a nivel mundial para el estudio de las dinámicas de transmisión (Allix-Beguec et al., 2008; Gurjav et al., 2014; Joseph et al., 2013; Maes et al., 2008; Nabyonga et al., 2011). Actualmente, el desarrollo de WGS ha permitido trazar con mayor precisión la transmisión reciente de TB. El estudio de grandes brotes producidos por MTB está permitiendo establecer un umbral, que actualmente se considera de 5 a 11 SNPs, para predecir un contacto epidemiológico consistente con la transmisión (Kato-Maeda et al., 2013; Perez-Lago et al., 2014a; Roetzer et al., 2013; Stucki et al., 2015; Walker et al., 2013)). Sin embargo, debido principalmente al coste de la técnica y al tiempo de la obtención de resultados, la aplicación prospectiva sistemática aún no es abordable.

En cuanto a la transmisión de TB bovina, la técnica más ampliamente utilizada ha sido el espoligotipado (Aranaz et al., 1996; Gutierrez Reyes et al., 2012; Zumarraga et al., 2013), debido a la baja discriminación que ofrece el RFLP-IS6110 en las cepas de *M. bovis*. Actualmente, se está extendiendo la utilización de MIRU-VNTR para el estudio de las dinámicas de transmisión y de brotes (Hauer et al., 2015; Je et al., 2015). Esta técnica ha demostrado ser más discriminatoria que el espoligotipado (Allix et al., 2006; Marianelli et al., 2015; Sun et al., 2012) particularmente en algunas cepas pertenecientes a ciertos espoligotipos muy prevalentes (Hauer et al., 2015; Rodriguez-Campos et al., 2013).

#### 4.2.4. Análisis de la complejidad clonal de la tuberculosis

Antes de la aplicación de las estrategias de genotipado, se asumía que la infección tuberculosa estaba causada por una sola cepa en cada caso. Sin embargo, el desarrollo de los métodos moleculares ha permitido desvelar la existencia de infecciones heterogéneas, producidas por más de una cepa, en un mismo episodio de TB. Distintos

estudios demuestran como en una misma muestra de un paciente tuberculoso pueden coexistir distintas cepas (infección mixta) (Andrade et al., 2009; Biffa et al., 2014; Biffa et al., 2010; Shamputa et al., 2006; Shamputa et al., 2004; Warren et al., 2004) o variantes clonales (infección policlonal) (Al-Hajoj et al., 2010; Shamputa et al., 2006; Shamputa et al., 2004). Adicionalmente, estudios más exhaustivos, en donde se analizan aislados de distintos tejidos, han desvelado una distribución heterogénea de las cepas o variantes clonales en los distintos tejidos, situación conocida como compartimentalización (Andrade et al., 2009; Bernard et al., 2014; Garcia de Viedma et al., 2006). Estos casos son de especial relevancia cuando las cepas involucradas presentan distinto perfil de sensibilidad antibiótica, pudiendo impactar, la mencionada heterogeneidad, sobre la eficacia del régimen terapéutico instaurado (Bernard et al., 2014; van Rie et al., 2005).

La aplicación de técnicas de genotipado mediante RFLP-IS6110 o espoligotipado no permite diferenciar la coexistencia de cepas o variantes debido a que el patrón obtenido corresponde a la suma de ambas cepas. En cambio, la técnica de MIRU-VNTR es especialmente adecuada para este fin, puesto que en estos casos se obtiene un genotipo mixto, en donde se observa más de un producto de amplificación en aquellos loci en los que las cepas presenten diferencias (Cohen et al., 2012).

## **5. Virulencia de los miembros del complejo *Mycobacterium tuberculosis***

El término virulencia hace referencia a la capacidad de un patógeno de causar morbilidad y mortalidad en el hospedador. La evolución de la TB tras la infección con el bacilo dependerá, como ya hemos mencionado, del estado inmune del hospedador, pero también de la virulencia de la cepa del MTBC que causa la enfermedad.

Una mayor virulencia de la cepa se puede traducir en: i) una disminución del tiempo desde la exposición hasta la enfermedad activa o bien desde el diagnóstico hasta la muerte; ii) una mayor transmisión de la micobacteria, y por tanto, en una mayor generación de casos secundarios; iii) una mayor prevalencia de la enfermedad causada por esa cepa (Parish y Brown, 2009).

### **5.1. Factores de virulencia en del complejo *Mycobacterium tuberculosis***

Al contrario de lo habitual en otras bacterias, los miembros del complejo no producen los factores de virulencia clásicos como toxinas, moléculas de adhesión o moléculas de invasión (Palomino et al., 2007). En este caso, la virulencia está determinada por ciertas proteínas estructurales o características metabólicas o genéticas. A pesar de que no se conoce con precisión la asociación entre estos factores de virulencia y la progresión de la TB, en los últimos años se han producido avances considerables en el conocimiento de las bases moleculares de la virulencia de las micobacterias. Una contribución relevante ha sido la identificación de genes esenciales de virulencia. La mayoría de éstos codifican para enzimas de vías metabólicas lipídicas, proteínas de la envuelta celular o reguladores y proteínas de sistemas de transducción de señales.

#### **5.1.1. Proteínas de envoltura y secreción**

En este grupo se encuadran las proteínas que son expuestas al medio exterior. Se conocen alrededor de doscientas proteínas y enzimas, las cuales juegan un papel relevante en la síntesis de moléculas de superficie celular (Sonnenberg y Belisle, 1997). Entre ellas cabe destacar las proteínas filtradas de cultivo (*Culture Filtrate Proteins*; CFPs) ESAT-6 y CFP-10. Ambas son secretadas por el sistema de secreción ESX-1 del MTBC, el cual se encuentra codificado en la región RD-1 del cromosoma. Este sistema media la exportación de factores de virulencia que permiten modular la respuesta inmune innata del hospedador en las primeras etapas de la infección (Skjot et al., 2000), por lo que su presencia resulta crítica para la virulencia de MTB y *M. bovis*.



### 5.1.2. Enzimas de metabolismo celular

Entre estas enzimas cabe destacar aquellas que afectan a:

- *Metabolismo de lípidos y ácidos grasos*: se ha demostrado que MTB es capaz de modificar su metabolismo. Cuando crece *in vitro* utiliza principalmente carbohidratos, mientras que en el hospedador es capaz de utilizar ácidos grasos. Esto hace que cepas mutantes de liasas (lcl), sintetetas (FadD33, PanC/PanD), lipasas (LipF) y fosfolipasas (fosfolipasas C) tengan disminuída su virulencia (Camacho et al., 1999; McKinney et al., 2000; Raynaud et al., 2002; Rindi et al., 2002; Sambandamurthy et al., 2002).

- *Biosíntesis de aminoácidos y purinas*: ensayos a partir de cepas mutantes en diferentes enzimas involucradas en la síntesis de aminoácidos y purinas (LeuD, TrpD, ProC, PurC, etc) han demostrado que estas enzimas son relevantes para la supervivencia de la micobacteria (Hondalus et al., 2000; Jackson et al., 1999; Smith et al., 2001).

- *Incorporación de metales*: el magnesio y el hierro son metales esenciales para la vida, y los defectos en la captación de estos elementos frecuentemente disminuyen la virulencia de los patógenos. Así, se ha comprobado que, mutantes en genes relacionados con la incorporación de metales (*mgtC*, *mtbB*, *ideR*) de MTB muestran una virulencia atenuada (Buchmeier et al., 2000; Gold et al., 2001).

- *Respiración anaeróbica y estrés oxidativo*: numerosos estudios han demostrado que MTB puede sobrevivir en ambientes microaerofílicos durante las fases tardías de la infección. Además, las bacterias aeróbicas cuentan con enzimas que degradan peróxidos producidos normalmente por la respiración aeróbica. Debido a esto, mutantes en genes (*katG*, *ahpC*, *sodA*, etc) que están involucrados en estas vías conllevan una disminución de la virulencia (Edwards et al., 2001; Heym et al., 1997; Wilson et al., 1995).

### 5.1.3. Reguladores transcripcionales

Estos reguladores controlan la transcripción de un número elevado de genes. Por lo tanto, cabe esperar que la inactivación de estos genes conduzca a una disminución de la virulencia de las cepas del MTBC. Esto ha sido particularmente demostrado mediante la generación de mutantes en distintos factores sigma (Collins et al., 2003; Collins et al., 1995; Jensen-Cain y Quinn, 2001), así como en los reguladores de dos componentes como PhoP-PhoR y PrrA-PrrB (Ewann et al., 2002; Perez et al., 2001).

## 5.2. Ensayos de evaluación de virulencia

Para el estudio de la virulencia se han desarrollado ensayos de infectividad en modelos celulares y animales.

### 5.2.1. Modelos celulares

Para la medida de la virulencia de los distintos miembros del MTBC se han usado principalmente macrófagos (Abdul-Majid et al., 2008; Camacho et al., 1999; Ewann et al., 2002; Glickman y Jacobs, 2001; Martínez-Neri et al., 2015; Perez et al., 2001), aunque también hay ensayos con células dendríticas (Bodnar et al., 2001; Hickman et al., 2002; Zhang et al., 2013) o neumocitos (Birkness et al., 1999; Yokobori et al., 2013). Estos modelos evalúan las primeras etapas de la infección, las cuales implican la fagocitosis del bacilo por parte de las células fagocíticas del alveolo pulmonar. Constituyen modelos relativamente sencillos y de bajo coste a partir de los cuales se obtienen resultados rápidamente.

Las células utilizadas pueden provenir de cultivos primarios, a partir de humanos o ratones (*ex vivo*), o de líneas celulares (*in vitro*). Los cultivos primarios constituyen la forma más natural y representativa de recrear la situación real *in vivo*, sin embargo, son difíciles de obtener y representan un fondo genético variable, sobre todo aquellos que se obtienen de donantes humanos. Por ello, las líneas celulares son las más utilizadas. Entre ellas cabe destacar las líneas obtenidas a partir de macrófagos alveolares de ratón: J774 y MH-S, y la línea celular monocítica humana: THP-1. Ésta última ha sido ampliamente usada en distintos estudios (Martínez-Neri et al., 2015; Saikolappan et al., 2012; Theus et al., 2004), en donde, tras la adición de ésteres de forbol, se diferencian a macrófagos cuya respuesta a la infección por MTB es bastante similar a la obtenida a partir de monocitos derivados de sangre humana (Stokes y Doxsee, 1999).

En estos modelos, para evaluar y comparar la virulencia de las distintas cepas, se utiliza la curva de crecimiento (*growth rate*), la cual es obtenida tras cuantificar la carga bacteriana en distintos puntos de la infección.

### 5.2.2. Modelos *in vivo*

Los modelos animales permiten estudiar todas las etapas de la infección. Para el estudio de la virulencia de las cepas se utilizan mayoritariamente el ratón, la cobaya y el conejo.

El modelo de ratón es el más utilizado ya que, en relación a los otros modelos animales, presenta múltiples ventajas. Por un lado, presentan bajos costes de mantenimiento y alta facilidad en el manejo. Por otro lado, existen cepas consanguíneas que presentan distintos niveles de resistencia a la TB (Kramnik et al., 2000). Aunque la progresión de la enfermedad difiere de la humana, el hecho de que los ratones sean más tolerantes a la infección que otros animales, hace posible la obtención de modelos de infección crónica.

Las cobayas son muy sensibles a la infección por TB, sin embargo, la gran ventaja radica en que las fases de la enfermedad, incluyendo las etapas iniciales de la formación del granuloma, son similares a las humanas (Smith, 2003). Sin embargo, en comparación con el ratón, la variedad de cepas consanguíneas es menor y los costes de mantenimiento son mayores.

El modelo de conejo presenta una gran ventaja con respecto a los otros modelos, y es que el granuloma formado en el pulmón presenta las mismas etapas de progresión que en humanos (caseificación, licuefacción y cavitación) (Converse et al., 1996; Subbian et al., 2011). Las desventajas son la falta de cepas endogámicas, así como los altos costes de mantenimiento y la dificultad en el manejo.

Los tres parámetros utilizados para la evaluación de la virulencia de MTB y *M. bovis* son la carga bacteriana, la morbilidad y la mortalidad de la cepa.

- *Carga bacteriana*: hace referencia al número de bacterias aisladas del animal infectado en diferentes momentos a lo largo de la infección. A partir de estos valores se definen las dinámicas de infección mediante curvas de crecimiento (*growth rates*) que permiten comparar la virulencia entre distintas cepas. Atendiendo a este parámetro, y de una forma teórica, Glickman diferenció cuatro fenotipos de virulencia (Glickman y Jacobs, 2001) (Figura 13); i) fenotipo *wild-type* (*wt*): la cepa replica de forma logarítmica durante 3 semanas y, tras el inicio de la inmunidad específica, persiste en el organismo; ii) fenotipo *severe growth in vivo* (*sgiv*): son cepas que no son capaces de replicar y se eliminan progresivamente; iii) fenotipo *growth in vivo* (*giv*): cepas que se multiplican en los primeros momentos de la infección pero en menor proporción que la *wild-type*; y iv) fenotipo *persistence genes* (*per*): cepas que crecen normalmente en las primeras etapas de la infección pero que disminuyen su replicación tras el inicio de la inmunidad celular.

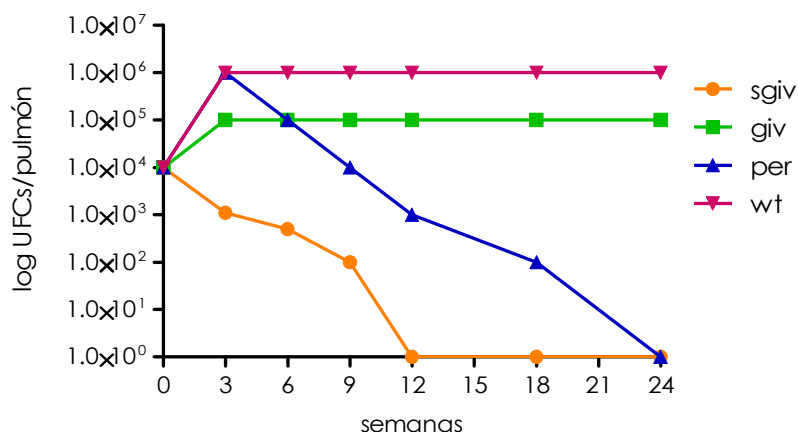


Figura 13. Fenotipos de virulencia en cepas de MTB en modelo de ratón

- *Morbilidad*: se evalúa mediante el análisis patológico e histopatológico del pulmón, así como de los distintos órganos que resultan afectados. A nivel macroscópico se evalúa el tamaño y la consistencia parenquimatosa del órgano (Lamichhane et al., 2006; Vandal et al., 2009) y a nivel histopatológico se estudia principalmente el grado de inflamación del órgano, los focos de infiltración celular y la reducción del espacio alveolar (Abdul-Majid et al., 2008; Lamichhane et al., 2006).

- *Mortalidad*: se refiere al porcentaje de animales infectados que mueren. Alternativamente se puede evaluar el tiempo transcurrido entre la infección y la muerte (Abdul-Majid et al., 2008).



## ORGANIZACIÓN DE LA TESIS

---



El marco general de esta tesis es el estudio de la complejidad clonal en las infecciones causadas por los dos patógenos más relevantes del complejo *Mycobacterium tuberculosis*: *Mycobacterium tuberculosis* y *Mycobacterium bovis*. Atendiendo al distinto grado de avance científico en estos dos patógenos con respecto a esta temática, y a la diferente naturaleza de los estudios, se ha organizado la tesis en tres capítulos.

## **CAPÍTULO I. Caracterización de la complejidad clonal existente en infecciones causadas por *Mycobacterium tuberculosis* y evaluación de su significado funcional.**

Este capítulo recoge la identificación y caracterización de las diferentes modalidades de infecciones complejas desde un punto de vista clonal (infecciones mixtas, policlonales y compartimentalizadas) en muestras poblacionales de entornos con moderada incidencia de tuberculosis. Además, se aborda el estudio específico del significado funcional de una de las modalidades de infección compleja, la infección policlonal. Para ello, se seleccionaron variantes clonales surgidas por fenómenos de microevolución en diferentes casos clínicos; se caracterizaron los cambios genómicos adquiridos y se evaluó su impacto funcional *in silico*, en ensayos de expresión genética, y en diversos modelos de infección celulares y animales. Los artículos generados como resultado de estos estudios son los siguientes:

1. **Navarro Y**, Herranz M, Pérez-Lago L, Martínez Lirola M; INDAL-TB, Ruiz-Serrano MJ, Bouza E, García de Viedma D. Systematic survey of clonal complexity in tuberculosis at a populational level and detailed characterization of the isolates involved. *J Clin Microbiol*. 2011; 49(12):4131-7
2. Pérez-Lago L, **Navarro Y**, Herranz M, Bouza E, García-de-Viedma D. Differences in gene expression between clonal variants of *Mycobacterium tuberculosis* emerging as a result of microevolution. *Int J Med Microbiol*. 2013; 303(8):674-7.
3. **Navarro Y**, Pérez-Lago L, Sisilema F, Herranz M, de Juan L, Bouza E, García-de-Viedma D. Unmasking subtle differences in the infectivity of microevolved *Mycobacterium tuberculosis* variants coinfecting the same patient. *Int J Med Microbiol*. 2013; 303(8):693-6.



## **CAPÍTULO II. Estudio exhaustivo de eventos de complejidad clonal en casos clínicos seleccionados.**

En este capítulo se engloban los estudios genotípicos, fenotípicos y clínico-epidemiológicos realizados a partir del análisis independiente de tres pacientes que ofrecen circunstancias de análisis singulares que permiten aumentar el conocimiento de aspectos relevantes en el entorno de las infecciones clonalmente complejas por MTB. Se han seleccionado para un estudio exhaustivo casos representativos de i) infección mixta por cepas con diferente sensibilidad a antibióticos, ii) reactivación clonalmente compleja e iii) infección persistente. Los estudios incluidos en este capítulo han generado los siguientes artículos:

4. Pérez-Lago L, Martínez Lirola M, **Navarro Y**, Herranz M, Ruiz-Serrano MJ, Bouza E, García-de-Viedma D. Co-Infection with Drug-Susceptible and Reactivated Latent Multidrug-Resistant *Mycobacterium tuberculosis*. *Emerg. Infect. Dis* 2015; 21(11):2098-2100
5. **Navarro Y**, Herranz M, Pérez-Lago L, Comas I, Sicilia J, Bouza E, García-de-Viedma D. In-depth characterization of *Mycobacterium tuberculosis* clonal variants from a recurrent patient. Enviado a *J Clin Microbiol*.
6. Pérez-Lago L, **Navarro Y**, Montilla P, Comas I, Herranz M, Rodríguez-Gallego C, Ruiz-Serrano MJ, Bouza E, García-de-Viedma D. Persistent infection by a *Mycobacterium tuberculosis* advantageous strain responsible for a massive outbreak. *J Clin Microbiol*. 2015; 53(10)

## **CAPÍTULO III. Caracterización de la complejidad clonal en infecciones causadas por *Mycobacterium bovis*.**

En este capítulo se lleva a cabo la puesta a punto de esquemas de genotipado que permitan optimizar las estrategias de rastreo de eventos de complejidad clonal en la infección por *Mycobacterium bovis*. Adicionalmente, se incluye un estudio específico dirigido a la identificación y caracterización en una muestra poblacional de una de las modalidades de infección compleja, la infección compartimentalizada, y se aborda la caracterización longitudinal de las dinámicas de adquisición de variantes clonales por microevolución en el contexto de explotaciones bovinas con infección crónica por *M. bovis*. Los artículos englobados en este capítulo son los siguientes:

7. **Navarro Y**, Herranz M, Romero B, Bouza E, Domínguez L, de Juan L, García-de-Viedma D. High-throughput multiplex MIRU-VNTR typing of *Mycobacterium bovis*. Res Vet Sci. 2014; 96(3):422-5.
8. **Navarro Y**, Romero B, Copano MF, Bouza E, Domínguez L, de Juan L, García-de-Viedma D. Multiple sampling and discriminatory fingerprinting reveals clonally complex and compartmentalized infections by *M. bovis* in cattle. Vet Microbiol. 2015; 175(1):99-104.
9. **Navarro Y**, Romero B, Bouza E, Domínguez L, de Juan L, García-de-Viedma D. Detailed chronological analysis of microevolution events in herds infected persistently by *Mycobacterium bovis*. Aceptado en Vet Microbiol



## OBJETIVOS

---



## **OBJETIVOS**

### **Capítulo I. Caracterización de la complejidad clonal existente en infecciones causadas por *Mycobacterium tuberculosis* y evaluación de su significado funcional.**

1. Evaluar la presencia de las distintas modalidades de complejidad clonal en la infección por *Mycobacterium tuberculosis* (MTB) en una población con moderada incidencia de tuberculosis.
2. Determinar el significado funcional de los cambios genómicos producidos por los fenómenos de microevolución en MTB que conducen a la aparición de infecciones policlonales.

### **Capítulo II. Estudio exhaustivo de eventos de complejidad clonal en casos clínicos seleccionados.**

3. Evaluar el posible impacto que la complejidad clonal en la infección por MTB pueda tener sobre el manejo diagnóstico y terapéutico de los casos implicados.
4. Comparar la dinámica de la microevolución en la infección por MTB en diferentes casos clínicos.

### **Capítulo III. Caracterización de la complejidad clonal en tuberculosis bovina.**

5. Poner a punto un formato de genotipado basado en MIRU-VNTR para optimizar el estudio de complejidad clonal en la infección por *Mycobacterium bovis*.
6. Rastrear y caracterizar una de las modalidades de complejidad clonal, infección compartimentalizada, en la infección por *Mycobacterium bovis*.
7. Abordar un estudio longitudinal de la dinámica de aparición de variantes clonales por microevolución en la infección por *Mycobacterium bovis*.



## **CAPÍTULO I**

**Caracterización de la complejidad clonal existente en  
infecciones causadas por *Mycobacterium tuberculosis* y  
evaluación de su significado funcional**

---





Con anterioridad a la introducción de las estrategias de tipado molecular en tuberculosis, se asumía que cada episodio de infección estaba causado por una única cepa de *Mycobacterium tuberculosis*. Sin embargo, la aplicación de los distintos métodos de genotipado ha permitido desvelar un grado de complejidad clonal en estas infecciones mayor de lo asumido. De esta forma, se comenzaron a identificar pacientes coinfectados simultáneamente por dos cepas diferentes (infecciones mixtas) o con presencia de variantes clonales (infecciones policlonales), probablemente generadas a partir de una misma cepa parental mediante fenómenos de microevolución. Algunos estudios más exhaustivos han descrito incluso modalidades de infección compartimentalizada, en las que las cepas o variantes que coinciden en un mismo individuo se distribuyen heterogéneamente entre los diferentes tejidos infectados.

Los fenómenos de complejidad clonal comenzaron a describirse en poblaciones con alta incidencia de tuberculosis. Posteriormente, su identificación se ha extendido a otras poblaciones de menor incidencia, aunque los reportes en la literatura en estos entornos se refieren a casos aislados. Nuestro primer objetivo consistió en evaluar la dimensión de los fenómenos de complejidad clonal en la tuberculosis, en una población de baja/moderada incidencia. Para ello se diseñó un primer estudio sistemático, en las poblaciones de Madrid y Almería, en el que se genotiparon 774 aislados de pacientes con tuberculosis exclusivamente pulmonar y 71 de pacientes con TB pulmonar y extrapulmonar. Mediante la aplicación de las técnicas de RFLP-IS6110 y MIRU-VNTR se detectaron 21 pacientes con tuberculosis compleja desde un punto de vista clonal [11 pacientes (1,6%) con TB respiratoria y 10 pacientes (14,1%) con TB pulmonar y extrapulmonar]. Entre ellos, 9 correspondieron a infecciones mixtas y 12 a infecciones policlonales.

Si bien la descripción de casos con infección mixta o policlonal es poco frecuente, el fenómeno de compartimentalización es aún más inusual. En nuestro estudio, en 9 casos (5 pacientes con infección mixta y 4 con infección policlonal) se constató que sus infecciones complejas eran, además, compartimentalizadas. Debido al porcentaje inesperadamente alto de este tipo de infecciones, decidimos comprobar que las compartimentalizaciones fueran estrictas, descartando la presencia en cada tejido infectado del resto de cepas/variantes detectadas en otros tejidos que hubieran podido pasar desapercibidas por aplicación de técnicas de genotipado de insuficiente sensibilidad. Para ello, se seleccionó el caso que presentaba el mayor número, cuatro, de variantes clonales compartimentalizadas. Se diseñaron PCRs alelo-específicas (ASO-PCRs) para cada variante, dirigidas a SNPs específicos identificados por secuenciación del genoma completo de cada variante. Tras pilotar la adecuada capacidad de las PCRs en

detectar variantes minoritarias en combinaciones controladas *in vitro* (las detectaban en proporciones 1/100-1/1000), se aplicaron a los aislados obtenidos de los tejidos con infección supuestamente compartimentalizada. En todos los casos se confirmó la estricta compartimentalización de la infección, y se constató una diferente composición de variantes en los diferentes tejidos infectados.

Tras la descripción sistemática de los casos de TB con infecciones complejas, nos centramos en la modalidad a la que se ha prestado menos atención en la literatura, la infección policlonal, con el objetivo de evaluar si los cambios sutiles que conducen a la aparición de variantes clonales pueden albergar un significado funcional. La primera etapa en este objetivo consistió en abordar un estudio *in silico* de las posibles implicaciones de estas variaciones, tanto en el número de copias IS6110, como en el número de repeticiones en tándem en los loci MIRU-VNTR. El mapeo, mediante LM-PCR, de los sitios de inserción de las IS6110 diferenciales entre las variantes clonales indicó que se localizaban intragénicamente, lo que afecta a la integridad de dichos genes, y por tanto puede estar asociado a un efecto funcional. El estudio *in silico* de las variantes que diferían en el marcador MIRU-VNTR indicó que las variaciones implicaban tanto a loci intragénicos, que pudieran modificar la estructura y función de las proteínas implicadas, como intergénicos que podrían estar asociados a un potencial efecto sobre la expresión de genes adyacentes. Tras el análisis *in silico* se decidió evaluar experimentalmente el posible efecto en expresión genética derivado de la variabilidad en el número de repeticiones identificadas en loci intergénicos. Se seleccionaron cuatro parejas de variantes isogénicas (con diferencias exclusivamente en 1-2 repeticiones de un locus MIRU-VNTR), y mediante RT-PCR cuantitativa se demostró que las variaciones, en tres de los cuatro loci analizados, conducían a una modificación sutil en la expresión de los genes contiguos.

La etapa final en la evaluación del significado funcional de la microevolución en la infección por MTB debía ser la comprobación de que alguno de los efectos identificados, tanto *in silico* como experimentalmente en ensayos de expresión, repercutieran en la capacidad infectiva de las variantes. Para ello, seleccionamos dos pacientes, uno de ellos con distribución compartimentalizada, infectados simultáneamente con un número superior al promedio de variantes clonales (cuatro y cinco) y abordamos ensayos de infectividad comparativa en macrófagos. En una primera etapa se estimó que, de existir diferencias de infectividad entre las variantes, éstas debían de ser sutiles, y por tanto los modelos celulares de infección estándar podían no detectarlas. Con el fin de adecuar los modelos de infección a esta situación, se expandieron las condiciones experimentales del modelo de infección celular a 4

versiones de infección diferentes: se diferenciaron macrófagos a partir de la línea celular humana THP-1, con o sin activación por IFN- $\gamma$ , y se abordaron infecciones por separado de cada cepa o coinfecciones competitivas. Gracias a la aplicación de estas cuatro estrategias se consiguió desvelar el diferente comportamiento infectivo de las variantes, poniendo en relevancia la importancia de la aplicación de diversas modalidades de ensayo para poder desvelar las diferencias infectivas sutiles existentes entre diferentes variantes clonales.

En conclusión, en este primer capítulo de la tesis se aportan estudios sistemáticos con base poblacional que permiten dimensionar con mayor precisión el fenómeno de la complejidad clonal por *Mycobacterium tuberculosis* en sus diferentes modalidades: mixta, policlonal y compartimentalizada, y que demuestran que es posible identificarlas en una frecuencia mayor a la esperada. La evaluación *in silico* de variantes clonales emergidas por fenómenos de microevolución indica que las variaciones acumuladas por éstas pueden tener un significado funcional. La evaluación de variantes clonales mediante ensayos de expresión muestra que pueden modificar la expresión de genes adyacentes. La puesta a punto de diferentes estrategias de infección en macrófagos aporta un modelo que permite desvelar las diferencias sutiles en infectividad mostradas por las variantes obtenidas de infecciones policlonales.



## Systematic Survey of Clonal Complexity in Tuberculosis at a Populational Level and Detailed Characterization of the Isolates Involved<sup>†</sup>

Yurena Navarro,<sup>1,2</sup> Marta Herranz,<sup>1,2</sup> Laura Pérez-Lago,<sup>1</sup> Miguel Martínez Lirola<sup>3</sup>  
 on behalf of INDAL-TB, María Jesús Ruiz-Serrano,<sup>1,2</sup>  
 Emilio Bouza,<sup>1,2</sup> and Darío García de Viedma<sup>1,2\*</sup>

*Servicio de Microbiología y Enfermedades Infecciosas, Hospital Gregorio Marañón, Madrid, Spain<sup>1</sup>;  
 CIBER Enfermedades Respiratorias-CIBERES, Spain<sup>2</sup>†; and  
 Complejo Hospitalario Torrecárdenas, Almería, Spain<sup>3</sup>*

Received 22 July 2011/Returned for modification 15 August 2011/Accepted 17 September 2011

**Clonally complex infections by *Mycobacterium tuberculosis* are progressively more accepted. Studies of their dimension in epidemiological scenarios where the infective pressure is not high are scarce. Our study systematically searched for clonally complex infections (mixed infections by more than one strain and simultaneous presence of clonal variants) by applying mycobacterial interspersed repetitive-unit (MIRU)–variable-number tandem-repeat (VNTR) analysis to *M. tuberculosis* isolates from two population-based samples of respiratory (703 cases) and respiratory-extrapulmonary (R+E) tuberculosis (TB) cases (71 cases) in a context of moderate TB incidence. Clonally complex infections were found in 11 (1.6%) of the respiratory TB cases and in 10 (14.1%) of those with R+E TB. Among the 21 cases with clonally complex TB, 9 were infected by 2 independent strains and the remaining 12 showed the simultaneous presence of 2 to 3 clonal variants. For the 10 R+E TB cases with clonally complex infections, compartmentalization (different compositions of strains/clonal variants in independent infected sites) was found in 9 of them. All the strains/clonal variants were also genotyped by IS6110-based restriction fragment length polymorphism analysis, which split two MIRU-defined clonal variants, although in general, it showed a lower discriminatory power to identify the clonal heterogeneity revealed by MIRU-VNTR analysis. The comparative analysis of IS6110 insertion sites between coinfecting clonal variants showed differences in the genes coding for a cutinase, a PPE family protein, and two conserved hypothetical proteins. Diagnostic delay, existence of previous TB, risk for overexposure, and clustered/orphan status of the involved strains were analyzed to propose possible explanations for the cases with clonally complex infections. Our study characterizes in detail all the clonally complex infections by *M. tuberculosis* found in a systematic survey and contributes to the characterization that these phenomena can be found to an extent higher than expected, even in an unselected population-based sample lacking high infective pressure.**

In recent years, the application of molecular tools such as IS6110-based restriction fragment length polymorphism (RFLP), spoligotyping, and mycobacterial interspersed repetitive-unit (MIRU)–variable-number tandem-repeat (VNTR) analysis has revealed that infection by *Mycobacterium tuberculosis* could be more complex than initially assumed. Several clonally complex phenomena have been observed, including mixed infections with more than one strain (29, 30, 35), simultaneous presence of clonal variants (microevolution phenomena) (1, 2), or even different distributions of strains/clonal variants infecting independent anatomical sites in the same patient (6, 15).

Most reports of clonal complexity phenomena are descriptions of anecdotal cases and/or studies of clonal complexity are often restricted to contexts where overexposure to tuberculosis (TB) can be expected. This makes it difficult to evaluate the

frequency at which we can expect this kind of infection to occur outside a high-incidence setting.

The main objective of our study was to systematically survey clonally complex infections (coinfections, microevolutions, and compartmentalizations) in unselected population-based samples so as to be able to calculate their proportion. We selected epidemiological contexts in which high infection pressure is not expected to facilitate clonally complex infections, namely, in settings with a moderate incidence of TB (Madrid and Almería, Spain; average incidence rates, 20.5 cases/100,000 inhabitants and 26.6 cases/100,000 inhabitants, respectively). Our secondary objectives were to perform a detailed genetic characterization of the strains/clonal variants involved in the clonally complex infections and to analyze the clinical and epidemiological backgrounds of the corresponding cases.

### MATERIALS AND METHODS

**Study samples.** Cases with microbiologically diagnosed respiratory TB were investigated for clonally complex infections (infections with two or more different strains/clonal variants infecting the same patient simultaneously). The population-based sample analyzed corresponded to all cases in which *M. tuberculosis* was isolated (initial diagnostic samples) from respiratory specimens between January 2003 and December 2009 at all hospitals in the province of Almería

\* Corresponding author. Mailing address: Servicio de Microbiología y Enfermedades Infecciosas, Hospital Gregorio Marañón, C/ Dr Esquerdo 46, 28007 Madrid, Spain. Phone: 91 4265104. Fax: 91 5044906. E-mail: dgriedma@microb.net.

† <http://www.ciberes.org/>.

<sup>‡</sup> Published ahead of print on 28 September 2011.

(Complejo Hospitalario Torrecárdenas, Hospital de Poniente, and Hospital La Inmaculada).

Cases in which *M. tuberculosis* was isolated from respiratory and extrapulmonary sites in the same episode (initial diagnostic samples) were investigated for compartmentalization (a clonally complex infection in which different strains/clonal variants are isolated from independent infected sites). The population-based sample corresponded to all cases fulfilling this requirement within the Almería sample mentioned above and cases from Hospital Gregorio Marañón (Madrid, area 1) during the same study period.

**Microbiological methods.** Clinical specimens were processed by standard methods and inoculated on Lowenstein-Jensen slants and in mycobacterial growth indicator tube (MGIT) liquid medium (Becton Dickinson, Sparks, MD). The *M. tuberculosis* cultures were stored frozen at  $-70^{\circ}\text{C}$  until analysis. Susceptibility testing for isoniazid, rifampin, streptomycin, and ethambutol was performed for the Almería isolates using a BacT/Alert 3D system (bioMérieux España SA, Madrid, Spain) and for the Madrid isolates using the mycobacterial growth indicator SIRE system (Becton Dickinson, Sparks, Maryland) according to standard methods.

**Clonal complexity analysis.** Genotypic analysis to identify cases with clonally complex infections was based on MIRU-VNTR and IS6110-based RFLP (IS6110-RFLP) fingerprinting. Two isolates from the same patient were considered clonal variants when they shared highly similar genotypes (we allowed differences in one MIRU locus or in two loci if they shared identical or highly similar RFLP types [differences in one band]) and unrelated strains when their MIRU types differed in three or more loci and their RFLP types were markedly different (differences in more than six bands).

A case was considered to have a polyclonal infection (simultaneous presence of two or more clonal variants or coinfection with more than one strain) when we detected more than one amplification product for one or more MIRU-VNTR loci. In these cases, polyclonality was confirmed by repeating simplex PCR of the locus or loci involved. Additionally, single colonies were obtained after subculturing dilutions of the primary culture on TH11 agar plates. Forty colonies were selected and inoculated in MGIT medium. After growth of the isolates, MIRU-VNTR was performed to confirm the presence of the allelic variants. After confirmation of polyclonality, independent colonies representing allelic variants were reinoculated on Lowenstein-Jensen slants, DNA was purified, and RFLP analysis was performed (33).

In some cases with special findings, according to the clonal complexity of the infection by *M. tuberculosis*, we analyzed by the MIRU-VNTR and RFLP analysis methods additional isolates from independent clinical specimens (the number was variable depending on availability) from the same episode.

**Genotyping methods.** (i) **MIRU-VNTR typing.** The analysis period included three sequential steps in the MIRU-VNTR procedures which were applied in our laboratory, and these influenced the MIRU-VNTR versions applied at each moment. First, a simplex MIRU analysis with 15 loci (MIRU-15) (3, 11) was applied for the systematic survey of respiratory cases with mixed infection; it was then switched to a simplex MIRU analysis with 24 loci (MIRU-24) (22), which was applied to analyze cases with respiratory-extrapulmonary TB. For those respiratory cases showing more than one MIRU-15 type, the extended MIRU format, MIRU-24, was also applied. Finally, multiplex MIRU-24 (31) was implemented and the last 111 samples were analyzed by application of this format.

(a) **Simplex PCR format.** We analyzed the original 12 MIRU-VNTR loci following conditions published elsewhere (32) and modified the amplification profile of the remaining 12 loci as described by Oelemann et al. (22). Amplified products were run in an agarose gel (2% MS-8; Pronadisa, Madrid, Spain) at 45 V for 18.5 h.

(b) **Multiplex PCR format.** The final reaction mixture (50  $\mu\text{l}$ ) included 25  $\mu\text{l}$  of PCR master mix (Qiagen multiplex PCR kit), 5  $\mu\text{l}$  of Q solution (Qiagen multiplex PCR kit), and 0.25  $\mu\text{M}$  each unlabeled and labeled oligonucleotide (3.9  $\mu\text{M}$  for locus 4156). The primers used for PCR amplification were described by Supply et al. (31). Amplification profiles were as described elsewhere (22), except for the number of cycles (20 cycles). PCR products were analyzed by capillary electrophoresis (4) using an ABI Prism 3100 genetic analyzer (Applied Biosystems, NLLab Centraal B.V., Haarlem, The Netherlands).

(ii) **IS6110-based RFLP typing.** All the isolates from each of the patients showing differences in MIRU types were also analyzed by IS6110-RFLP following international standardization guidelines (33). RFLP types were used to establish identities/differences only when they had more than six IS6110 copies.

(iii) **LM-PCR.** The coinfecting clonal variants showing subtle differences between their RFLP types were analyzed by ligation-mediated PCR (LM-PCR) to map the IS6110 locations.

The protocol used was based on that of Prod'homme et al. (23) with modifications. Briefly, the DNA was digested with the restriction enzyme XmaI (NEB)

and ligated with adapter primers Rxma24/rxma12 (22a; Rxma24 is 5' AGC ACT CTC CAG CCT CTC AAC GAC 3', and rxma12 is 5' CCG GGT CGT TGA 3') by incubation overnight with T4 DNA ligase (New England BioLabs, MA) at  $16^{\circ}\text{C}$ . The products were amplified by PCR with primers ISA1 and ISA3 (21) and the linker primer Rxma24 using AmpliTaq Gold (Applied Biosystems). The PCR consisted of 35 cycles at  $95^{\circ}\text{C}$  for 45 s,  $65^{\circ}\text{C}$  for 45 s, and  $72^{\circ}\text{C}$  for 8 min. The amplified products were separated by electrophoresis in a 1.8% agarose gel and purified using GFX PCR DNA and a Gel Band purification kit (GE Healthcare; Buckinghamshire, United Kingdom). The purified fragments were sequenced with the ISA1 and ISA3 primers in a 3130xl genetic analyzer (Applied Biosystems, Carlsbad, CA). The IS6110 insertion sites were mapped by investigating the homology of the LM-PCR product sequences with the H37Rv reference sequence genome in the TB Database (25).

**Population-based molecular epidemiology databases.** We used the genotypic databases from two population-based studies run in Madrid (area 1, 2003 to 2009) (5) and Almería (2004 to today) (20) in which all *M. tuberculosis* isolates are labeled as clustered or orphan.

**Clinical/epidemiological data.** Clinical and epidemiological information was obtained from clinical records. For cases coinfecting by two independent strains, we looked for risk factors for TB, overexposure to other TB cases, and existence of previous TB. For the cases with the simultaneous presence of clonal variants, we looked for risk factors for TB, diagnostic delay (between onset of symptoms and diagnosis), and existence of previous TB.

## RESULTS

**Analysis of patients with respiratory TB.** Among the 703 patients with respiratory TB, polyclonality was observed in 11 cases (1.6%; Fig. 1a) by the simultaneous detection of more of one allelic variants in 1 to 11 MIRU loci. All strains were susceptible. Additional genotyping of single colonies from these cases allowed us to confirm the concurrent presence of 2 different genotypes in 10 cases and even 3 different genotypes in the remaining case (case 11; Fig. 1a).

Among the 11 cases with complex infection, coinfection with two independent strains was considered in 4 cases due to differences in 7 to 11 loci (36.4%, cases 1 to 4). In the remaining seven cases (63.6%; cases 5 to 11; Fig. 1a), we observed the simultaneous presence of related clonal variants (differences in only 1 or 2 loci). We also performed IS6110-RFLP analysis to extend the genotypic characterization of the strains/clonal variants involved in the clonally complex cases detected by MIRU-VNTR analysis. In all four cases considered coinfecting by independent strains, the RFLP types obtained were markedly different (Fig. 1a), thus confirming the unrelatedness of the coinfecting strains. For the remaining seven cases showing the simultaneous presence of clonal MIRU variants, RFLP analysis failed to detect heterogeneity (Fig. 1a). In order to evaluate whether extended screening could also facilitate identification of variability by RFLP analysis, we selected the case with the highest clonal complexity, as revealed by MIRU (case 11, three different MIRU types). Single colonies cultured from two additional respiratory specimens (specimens 2 and 3; Fig. 1b) were analyzed by MIRU-VNTR and RFLP analysis. Only two of the three MIRU variants found in the isolates from the first specimen, specimen 1 (Fig. 1a), were detected (MIRU types A and B). In the isolates from specimen 2, RFLP again failed to detect variability (Fig. 1b). However, in the isolates from the other specimen (specimen 3), in addition to the shared RFLP type, two new RFLP variants (RFLP2 and RFLP3) were identified (differing in only one band; Fig. 1a and b). Finally, LM-PCR was applied to map the distribution of the IS6110 insertion sites from RFLP2 and RFLP3 compared with those from RFLP1. LM-PCR electrophoresis patterns again

a	Patients reference code		MIRUtype	RFLPtype		
1	A	272434442262325242213423	1			Different strains
	B	251333243262325142213423	2			
2	A	254333243232325262213413	1			
	B	254432322122235262213423	2			
3	A	24443444222325252212423	1			
	B	246433342121336162213423	2			
4	A	242343232452225252213422	1			
	B	263834233473276252213423	2			
5	A	252343242232525252212423	1			
	B	252343242242525252212423	1			
6	A	244433233433645252213423	1			
	B	244433233433665252213423	1			
7	A	233433442213437262213421	1			
	B	233433442213438262213421	1			
8	A	253533233333435252213423	1			
	B	253533233433435252213423	2			
9	A	253423222212433262213421	1			
	B	253423222212435262213421	1			
10	A	252533232432425232113223	1			
	B	252533233432424232113223	1			
11	A	254422222212436261213421	1			
	B	254423222212436261213421	1			
	C	254424222212436261213421	1			
b	Isolates from Specimen2	A	254422222212436261213421	1		Clonal variants
		B	254423222212436261213421	1		
	Isolates from Specimen3	A	254422222212436261213421	2		
		B	254423222212436261213421	3		

FIG. 1. (a) Genotyping analysis of isolates from patients with respiratory TB and clonally complex infections. (b) Genotypic analysis of isolates from additional specimens for case 11. Asterisks, difference in the locations of the IS6110 band in the RFLP types. Boldface indicates MIRU loci with differences in numbers of tandem repeats.

reproduced the variability between the three variants, and sequence analysis revealed in RFLP2 the absence of an IS6110 copy in the *cut-1* gene, which codes for a cutinase (Rv1758), and an additional IS6110 copy in RFLP3 interrupting the gene for a conserved hypothetical protein (Rv1682).

**Analysis of patients with respiratory and extrapulmonary TB.** Among the 1,733 TB patients from the two population-based samples analyzed (Madrid and Almería), 86 (4.96%) had concurrent respiratory and extrapulmonary *M. tuberculosis* isolates. The extrapulmonary specimens most frequently yielding *M. tuberculosis* for cases with respiratory TB were urine (33 cases), blood (30 cases), pleural fluid (19 cases), lymph node (10 cases), biopsy specimens (7 cases), and cerebrospinal fluid (7 cases). In most cases (54 patients; 62.8%), *M. tuberculosis* was isolated from only one extrapulmonary specimen, in addition to the respiratory sample (group 1). In 32 cases (37.2%), *M. tuberculosis* was isolated from two, three, or four different extrapulmonary specimens (group 2).

For 71 of the respiratory-extrapulmonary TB patients

(82.6%), all the *M. tuberculosis* cultures were available for analysis. A single MIRU type was shared by the respiratory and extrapulmonary isolates in 61 patients (86%). In the remaining 10 cases (14%), we detected clonally complex infections (presence of more than one coinfecting strain/clonal variant; Fig. 2). All strains were susceptible. Five patients (cases A to E), all belonging to group 1, were coinfecting by two independent strains (strains differing in 3 to 17 loci), and compartmentalization was observed in all cases, because each of the two coinfecting strains was recovered either from respiratory sites or from extrapulmonary sites (Fig. 2). In one case (case C), spoligotyping data were available, and these data revealed coinfection by *M. tuberculosis* (blood) and *Mycobacterium caprae* (sputum). For the remaining five cases (one from group 1 and four from group 2), the simultaneous presence of 2 to 3 clonal variants was observed (cases F to J; differences in 1 to 2 loci). Except for case G, in which two MIRU variants were found at three different sites, compartmentalization was identified for the remaining four cases (cases F, H, I, and J),



Reference Code	(n) Isolates	MIRUtype	RFLPtype	
A	Respiratory	A 243433142152238262213423	1	Different strains
	Urine	B 262424442232326242213423	2	
B	Respiratory	A 253533233453267252213423	1	
	Blood	B 253533233431437252213423	1	
C	Respiratory	A 552645354112412242223352	1	
	Blood	B 254533533451446252213423	-	
D	Respiratory	A 253333233431347 (MIRU24 n.a.)	1	
	Urine	B 2463332334313462532_3422	1	
E	Respiratory	A 241462344443_23242224321	1	
	LymphNode	B 242545353433566253213523	2	
F	(2) Respiratory	A 256423342123237172211423	1	Clonal variants
		B 251423342123237172211423	1	
	Blood	A 256423342123237172211423	1	
G	(3) Respiratory	A 234333242232325262213423	1	
		B 234333242232325262211423	1	
		A 234333242232325262213423	1	
	Blood	B 234333242232325262211423	1	
		A 234333242232325262213423	1	
	(2) Urine	B 234333242232325262211423	1	
H	(3) Respiratory	A 253533233423533252213423	1	
		B 253533233423533252113423	2	
		A 253533233423533252213423	3	
	Blood	B 253533233423533252113423	2	
		C 223533233423533252113423	2	
		A 253533233423533252213423	1	
I	(3) Respiratory	A 251333243232326262214423	1	
	(2) Urine	A 251333243232326262214423	1	
	Biopsy	B 251333243232326272214423	1	
		A 251333243232326262214423	1	
J	Respiratory	A 252243242242325251213423	1	
	Blood	A 252243242242325251213423	1	
	Urine	B 242243242242325251213423	1	
		A 252243242242325251213423	1	

FIG. 2. Genotyping analysis for the isolates from patients with respiratory and extrapulmonary TB and clonally complex infections. n.a., not available. Asterisks, the location of the additional *IS6110* band in the RFLP type. The number of isolates is indicated before the specimen type for the cases in which additional isolates from independent specimens were available for analysis. Boldface indicates MIRU loci with differences in numbers of tandem repeats.

because of the presence of at least one of the variants in some but not all of the infected sites. The distribution of variants in patient H is worthy of mention: whereas two variants were present in sputum, an additional variant was found in blood, and only one of the respiratory variants was recovered from urine.

In order to analyze the distribution of clonal variants in the infected sites in more detail, we genotyped additional isolates from independent specimens from these patients (available for patients F to I; Fig. 2). In only one case (case H), the distribution of variants in the additional specimens differed (only one variant of the two identified in the first specimen was found in the isolate from an independent sputum sample).

*IS6110*-RFLP analysis was performed with all the isolates discriminated by MIRU-VNTR typing (Fig. 2). Different RFLP patterns were obtained for all except two cases coinfecting with independent strains; in these two cases (cases B and D), the low number of *IS6110* copies (4, 5) did not allow us to draw conclusions. For the coinfecting clonal variants revealed by MIRU analysis, RFLP failed to detect differences between them except in

case H, in which MIRU types B and C shared the same RFLP type (RFLP2), whereas the remaining MIRU type (type A) was split into two different RFLP types (RFLP1 and RFLP3). These two new RFLP-defined variants further increased the complexity of the compartmentalization observed in case H when analyzing the distribution of MIRU-defined variants, as variant RFLP3 was found only in blood, whereas variant RFLP1 was recovered from sputum and urine (Fig. 2). Compared with variant RFLP1, the application of LM-PCR confirmed the presence of a new *IS6110* copy in variant RFLP2 interrupting a PPE family protein (PPE34, Rv1917c) and in variant RFLP3 interrupting the gene for a conserved hypothetical protein (Rv1754c).

**Epidemiological/clinical interpretation of clonal complexity findings.** Once the isolates from clonally complex infections were analyzed, we classified cases according to specific clinical and epidemiological features (Tables 1 and 2).

First, among the cases coinfecting with more than one strain (cases 1 to 4 and A to E; Table 1), all but one were immigrants from countries where TB is endemic, two were HIV infected, and two were alcoholics. Five patients were homeless or lived in sub-

TABLE 1. Clinical and epidemiological features of patients coinfecting with independent strains

Patient reference code	Nation of origin	Risk factor(s)	Overexposure risk	Previous TB
1	Morocco	Alcoholism, smoking	Substandard/shared housing	No
2	Romania			NA <sup>a</sup>
3	Morocco	Smoking	Substandard/shared housing	No
4	Algeria			No
A	Brazil	HIV positive		NA
B	Spain	HIV positive, intravenous drug user, smoking	Homeless	No
C	Ghana		Substandard/shared housing	Yes
D	Mali	Alcoholism	Substandard/shared housing	No
E	Mauritania			NA

<sup>a</sup> NA, not available.

standard shared housing (Table 1). In addition, one case had a TB episode previous to the present one. Second, for the cases infected with different clonal variants (cases 5 to 11 and F to J; Table 2), diagnostic delay was found in eight cases (2 to 31 months; Table 2). Three cases had previously had TB (Table 2).

Finally, we integrated the molecular epidemiology data from the studies run in Madrid and in Almería (5, 20). We analyzed whether strains isolated from clonally complex cases were involved in clusters (recent infection) or whether they corresponded to orphan strains (reactivations of remote infections). For the nine cases with mixed infections with two unrelated strains, both coinfecting strains were clustered in two patients (cases 2 and E); in another three patients (A, B, and D), one of the strains was clustered, while the other was orphan. For the remaining four cases, both strains were orphan.

We identified a clustered variant in 6 of the 12 cases infected with clonal variants.

## DISCUSSION

Clonal complexity is increasingly accepted to be a feature of *M. tuberculosis* infection. From an epidemiological point of view and to ensure precise tracking of recent transmission in molecular epidemiology programs, it is essential to identify those cases coinfecting with more than one strain or clonal

variant. Another important consideration is the possibility that strains with phenotypic differences (in virulence, infectivity, and susceptibility) can participate in clonally complex infections (28), and this could have an impact on diagnosis, clinical practice, and therapy (6, 17, 28, 29, 34).

The number of studies on clonal complexity in *M. tuberculosis* infection has increased in recent years (8, 10, 18). However, some of these studies examine anecdotal cases (2) and others analyze this phenomenon only in specific *M. tuberculosis* lineages (35) or specific phenotypes (34). Those which follow population-based designs to determine the proportion of clonally complex TB cases are performed mainly in epidemiological contexts with a markedly high incidence of TB (8, 10, 29, 30, 35) and/or where the possibility of overexposure is more likely (28).

We measured the frequency of clonally complex infections in epidemiological scenarios with a moderate incidence of TB. Another differential aspect of our study was the decision to independently analyze two versions of clonal complexity (coinfection with different strains and simultaneous presence of clonal variants) and to explore each of them in two kinds of patients, namely, those with respiratory TB and those with respiratory-extrapulmonary TB. This design allowed us to cover the spectrum of clonal complexity: coinfection with different strains, coexistence of clonal variants (likely due to microevolution phenomena), compartmentalized coinfections, and compartmentalized distribution of clonal variants. Our data demonstrate that clonal complexity in the infection by *M. tuberculosis* is not anecdotal, especially in cases with simultaneous infection at independent sites. The real figures for clonal complexity in this study could be even higher if we had included more than a single sputum specimen in our screening design (13, 18, 19, 28).

The application of MIRU-VNTR typing to investigate clonal complexity was key for exploration of these events in an extensive population-based sample (774 patients). Other standard strategies applied, such as analysis of multiple independent colonies (12, 14) or observation of low-intensity bands by RFLP (9), are not suitable for large samples. Besides, if RFLP had been selected as the screening strategy, we would not have identified most of the cases infected with clonal variants and even some of the cases infected by different strains according to MIRU data.

As for the nine cases with mixed infection by independent strains, we did not detect any cases with more than two strains. The presence of two independent strains in the same episode of a TB case could be considered the result of simultaneous coinfection, superinfection, or reactivation of an old infection coincidental with a recent infection (due either to a lack of containment

TABLE 2. Clinical and epidemiological features of patients with simultaneous presence of clonal variants

Patient reference code	Nation of origin	Risk factor(s)	Diagnosis delay (mo)	Previous TB
5	Spain	Multiple drug user	No	No
6	Morocco		6	No
7	Bolivia		3	No
8	Spain	Alcoholism, smoking	Yes (NA <sup>a</sup> )	No
9	Morocco		7	No
10	Spain		31	No
11	Spain		No	Yes
F	Spain	HIV positive, intravenous drug user	2	No
G	Spain	HIV positive	No	No
H	Spain		No	Yes
I	Spain	HIV positive	2	No
J	Nigeria	HIV positive	Yes (NA)	Yes

<sup>a</sup> NA, not available.

of a previous infection in immunocompromised hosts or to the immune impairment associated with the new infection). It is not easy to associate a specific explanation with a particular patient. However, we tried to identify which cases fulfilled clinical and epidemiological features that could allow the options explained above. The hypothesis of coinfection/superinfection could be plausible for the five cases (all but one of whom were immigrants) who were either homeless or lived in shared substandard housing. As one case had already had TB, the possibility of reactivation/recent infection could also be considered. This case corresponded to an immigrant from Ghana who was coinfecting with two different species, *M. tuberculosis* and *M. caprae*. Infections by *M. caprae* are extremely uncommon in Spain (26); therefore, the hypothesis of reactivation of *M. caprae* by recent *M. tuberculosis* infection seems plausible.

We explored a novel application to processing of the data obtained from the long-term molecular epidemiology surveys run in the study populations in order to find explanations for the cases of mixed infections by independent strains. We used these data to determine whether the strains involved in patients with mixed infections were involved in clusters (recent transmissions) or were orphan (reactivations of remote infections). An orphan strain coincided with a clustered strain in three cases, thus supporting the possibility of reactivation/recent infection. In another two cases, both strains were clustered, suggesting possible coinfection/superinfection.

As for cases with the simultaneous presence of clonal variants, most involved two variants, although four and five clonal variants were found in two cases. To identify these cases, it was necessary to consider MIRU and RFLP typing data together, because a MIRU type was split into two RFLP variants.

As with cases of mixed infection, we explored the clinical and epidemiological backgrounds of the 12 cases with clonal variants to evaluate three possible explanations: variants could have appeared during the active infection as a result of a diagnostic delay, variants could have appeared during the latent phase in cases who had previously had TB, and the patients were already infected by variants which had microevolved in previous hosts. In most cases, a diagnostic delay had occurred, and in one case it reached 31 months. Three cases had previously had TB; these included the cases with the highest number of variants (four and five variants; cases H and 11). Considering molecular and epidemiology data, in four cases none of the coinfecting variants was clustered and in six cases only one of the coinfecting variants was clustered, thus minimizing the probability of microevolution in hosts preceding the infection of the analyzed cases. The remaining two cases corresponded to the first year of the molecular survey; therefore, we lacked sufficient data to assign previous orphan/clustered status to the variants.

Identification of clonal variants may be considered a refined exercise with no clinical significance. However, compartmentalization is sometimes observed in cases with clonal variants. If these clonal variants are not equally distributed at the different infected sites, then these subtle genotypic differences could entail an adaptive advantage. In cases coinfecting with two independent strains and with a compartmentalized infection, the strain infecting the extrapulmonary site has higher infectivity in *in vitro* and *in vivo* models (15). Similarly, a genotypic change in a clonal variant could have made it able to more efficiently infect the extrapulmonary site, as in case F, in

which only one of the two variants from sputum was detected in blood. The alternative explanation could be that the genotypic modification leading to the emergence of a clonal variant is the consequence of an adaptation of the strain to the specific circumstances of the extrapulmonary site. Examples of this hypothesis could be seen cases I and J, in which one variant not detected in sputum was found at an extrapulmonary site. The marked clonal complexity in case H with the simultaneous presence of four clonal variants and with a different clonal distribution in each of the three sites involved could result from the combination of the two possibilities mentioned above.

We mapped the IS6110 sequences of the clonal variants which showed subtle differences between their RFLP patterns to evaluate whether potential functional differences could be considered. In one case, two variants differed in an IS6110 sequence located in or absent from Rv1758. An IS6110 copy in the same sequence has also been found in strain H37Rv, and it has been reported that it might have a dual impact: on the expression of both cutinase, an enzyme involved in the lipid metabolism (27), and phospholipase *plcD* (16), an enzyme considered a virulence factor in certain studies (24). For the second case infected with clonal variants who was analyzed, we detected an IS6110 copy either present or absent in a region coding for the protein PPE34, which has recently been found to facilitate a shift toward the Th2 immune response, aiding the immune evasion by mycobacteria (7).

Our study enabled us to assess that clonally complex *M. tuberculosis* infections must also be considered in populations not subject to high infective pressure. The systematic survey of clonally complex infections in a population-based sample allowed us to calculate that the proportion of cases in which they occur is higher than expected. The application of an extended scheme for genotypic characterization led to the detailed description of different modalities of clonal complexity in cases with either respiratory TB only or respiratory-extrapulmonary TB. The combination of genotyping data with clinical, epidemiological, and molecular data could help us to identify potential causes for these kinds of infections and provide more information on their clinicopathologic significance.

#### ACKNOWLEDGMENTS

We are grateful to Ainhoa Simón Zárate and Milagros González for their participation in the sequencing analysis.

We are indebted to Thomas O'Boyle for proofreading the manuscript.

This work was partially supported by the Fondo de Investigaciones Sanitarias (FIS; reference no. S09/02205), Junta de Andalucía (PI-0444/2008 and PI-0306-2009), and SEPAR (763-09). The 3130xl genetic analyzer was partially financed by grants from the Fondo de Investigaciones Sanitarias (IF01-3624, IF08-36173). Laura Pérez-Lago holds a Juan de la Cierva contract from the Ministerio de Ciencia e Innovación (reference no. JCI-2009-05713). Yurena Navarro holds a grant from CIBERES 4<sup>a</sup> Convocatoria de Becas de Iniciación a la Investigación. Ainhoa Simón Zárate, who assisted with sequencing analysis, holds a grant from the Fondo de Investigaciones Sanitarias (Línea Instrumental Secuenciación).

None of us has a conflict of interest to report.

#### REFERENCES

1. Aga, R. S., et al. 2006. Microevolution of the direct repeat locus of *Mycobacterium tuberculosis* in a strain prevalent in San Francisco. *J. Clin. Microbiol.* 44:1558–1560.
2. Al-Hajj, S. A., et al. Microevolution of *Mycobacterium tuberculosis* in a tuberculosis patient. *J. Clin. Microbiol.* 48:3813–3816.

3. Alonso-Rodríguez, N., et al. 2008. Evaluation of the new advanced 15-loci MIRU-VNTR genotyping tool in *Mycobacterium tuberculosis* molecular epidemiology studies. *BMC Microbiol.* 8:34.
4. Alonso-Rodríguez, N., et al. 2009. Prospective universal application of mycobacterial interspersed repetitive-unit-variable-number tandem-repeat genotyping to characterize *Mycobacterium tuberculosis* isolates for fast identification of clustered and orphan cases. *J. Clin. Microbiol.* 47:2026–2032.
5. Alonso Rodríguez, N., et al. 2009. Transmission permeability of tuberculosis involving immigrants, revealed by a multicentre analysis of clusters. *Clin. Microbiol. Infect.* 15:435–442.
6. Andrade, M. K., S. M. Machado, M. L. Leite, and M. H. Saad. 2009. Phenotypic and genotypic variant of MDR-*Mycobacterium tuberculosis* multiple isolates in the same tuberculosis episode, Rio de Janeiro, Brazil. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 42:433–437.
7. Bansal, K., et al. Src homology 3-interacting domain of Rv1917c of *Mycobacterium tuberculosis* induces selective maturation of human dendritic cells by regulating PI3K-MAPK-NF-kappaB signaling and drives Th2 immune responses. *J. Biol. Chem.* 285:36511–36522.
8. Cohen, T., D. Wilson, K. Wallengren, E. Y. Samuel, and M. Murray. Mixed-strain *Mycobacterium tuberculosis* infections among patients dying in a hospital in KwaZulu-Natal, South Africa. *J. Clin. Microbiol.* 49:385–388.
9. de Boer, A. S., et al. 2000. Genetic heterogeneity in *Mycobacterium tuberculosis* isolates reflected in IS6110 restriction fragment length polymorphism patterns as low-intensity bands. *J. Clin. Microbiol.* 38:4478–4484.
10. Dickman, K. R., et al. Detection of multiple strains of *Mycobacterium tuberculosis* using MIRU-VNTR in patients with pulmonary tuberculosis in Kampala, Uganda. *BMC Infect. Dis.* 10:349.
11. Evans, J. T., et al. 2004. Automated high-throughput mycobacterial interspersed repetitive unit typing of *Mycobacterium tuberculosis* strains by a combination of PCR and nondenaturing high-performance liquid chromatography. *J. Clin. Microbiol.* 42:4175–4180.
12. García de Viedma, D., et al. 2005. Association between the infectivity of *Mycobacterium tuberculosis* strains and their efficiency for extrapulmonary infection. *J. Infect. Dis.* 192:2059–2065.
13. García de Viedma, D., et al. 2006. Complex clonal features in an *Mycobacterium tuberculosis* infection in a two-year-old child. *Pediatr. Infect. Dis. J.* 25:457–459.
14. García de Viedma, D., M. Marin, M. J. Ruiz, and E. Bouza. 2004. Analysis of clonal composition of *Mycobacterium tuberculosis* isolates in primary infections in children. *J. Clin. Microbiol.* 42:3415–3418.
15. García de Viedma, D., M. Marin, M. J. Ruiz Serrano, L. Alcalá, and E. Bouza. 2003. Polyclonal and compartmentalized infection by *Mycobacterium tuberculosis* in patients with both respiratory and extrapulmonary involvement. *J. Infect. Dis.* 187:695–699.
16. Ho, T. B., B. D. Robertson, G. M. Taylor, R. J. Shaw, and D. B. Young. 2000. Comparison of *Mycobacterium tuberculosis* genomes reveals frequent deletions in a 20 kb variable region in clinical isolates. *Yeast* 17:272–282.
17. Huang, H. Y., et al. 2010. Mixed infection with Beijing and non-Beijing strains and drug resistance pattern of *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Clin. Microbiol.* 48:4474–4480.
18. Mallard, K., et al. Molecular detection of mixed infections of *Mycobacterium tuberculosis* strains in sputum samples from patients in Karonga District, Malawi. *J. Clin. Microbiol.* 48:4512–4518.
19. Martín, A., M. Herranz, M. J. Ruiz Serrano, E. Bouza, and D. García de Viedma. The clonal composition of *Mycobacterium tuberculosis* in clinical specimens could be modified by culture. *Tuberculosis (Edinb.)* 90:201–207.
20. Martínez-Lirola, M., et al. 2008. Advanced survey of tuberculosis transmission in a complex socioepidemiologic scenario with a high proportion of cases in immigrants. *Clin. Infect. Dis.* 47:8–14.
21. Mendiola, M. V., C. Martín, I. Otal, and B. Gicquel. 1992. Analysis of the regions responsible for IS6110 RFLP in a single *Mycobacterium tuberculosis* strain. *Res. Microbiol.* 143:767–772.
22. Oelemann, M. C., et al. 2007. Assessment of an optimized mycobacterial interspersed repetitive-unit-variable-number tandem-repeat typing system combined with spoligotyping for population-based molecular epidemiology studies of tuberculosis. *J. Clin. Microbiol.* 45:691–697.
- 22a. Pérez-Lago, L., M. Herranz, M. Martínez Lirola, E. Bouza, and D. García de Viedma. 2011. Characterization of microevolution events in *Mycobacterium tuberculosis* strains involved in recent transmission clusters. *J. Clin. Microbiol.* 49:3771–3776.
23. Prod'homme, G., et al. 1997. Rapid discrimination of *Mycobacterium tuberculosis* complex strains by ligation-mediated PCR fingerprint analysis. *J. Clin. Microbiol.* 35:3331–3334.
24. Raynaud, C., et al. 2002. Phospholipases C are involved in the virulence of *Mycobacterium tuberculosis*. *Mol. Microbiol.* 45:203–217.
25. Reddy, T. B., et al. 2009. TB database: an integrated platform for tuberculosis research. *Nucleic Acids Res.* 37:D499–D508.
26. Rodríguez, E., et al. 2009. Human tuberculosis due to *Mycobacterium bovis* and *M. caprae* in Spain, 2004–2007. *Int. J. Tuberc. Lung Dis.* 13:1536–1541.
27. Schue, M., et al. Two cutinase-like proteins secreted by *Mycobacterium tuberculosis* show very different lipolytic activities reflecting their physiological function. *FASEB J.* 24:1893–1903.
28. Shamputa, I. C., et al. 2006. Mixed infection and clonal representativeness of a single sputum sample in tuberculosis patients from a penitentiary hospital in Georgia. *Respir. Res.* 7:99.
29. Shamputa, I. C., et al. 2004. Genotypic and phenotypic heterogeneity among *Mycobacterium tuberculosis* isolates from pulmonary tuberculosis patients. *J. Clin. Microbiol.* 42:5528–5536.
30. Stavrum, R., et al. 2009. High diversity of *Mycobacterium tuberculosis* genotypes in South Africa and preponderance of mixed infections among ST53 isolates. *J. Clin. Microbiol.* 47:1848–1856.
31. Supply, P., et al. 2006. Proposal for standardization of optimized mycobacterial interspersed repetitive-unit-variable-number tandem repeat typing of *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Clin. Microbiol.* 44:4498–4510.
32. Supply, P., et al. 2000. Variable human minisatellite-like regions in the *Mycobacterium tuberculosis* genome. *Mol. Microbiol.* 36:762–771.
33. van Embden, J. D., et al. 1993. Strain identification of *Mycobacterium tuberculosis* by DNA fingerprinting: recommendations for a standardized methodology. *J. Clin. Microbiol.* 31:406–409.
34. van Rie, A., et al. 2005. Reinfection and mixed infection cause changing *Mycobacterium tuberculosis* drug-resistance patterns. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 172:636–642.
35. Warren, R. M., et al. 2004. Patients with active tuberculosis often have different strains in the same sputum specimen. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 169:610–614.







Contents lists available at ScienceDirect

## International Journal of Medical Microbiology

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/ijmm](http://www.elsevier.com/locate/ijmm)

## Short Communication

Differences in gene expression between clonal variants of *Mycobacterium tuberculosis* emerging as a result of microevolution

Laura Pérez-Lago<sup>a,b,d</sup>, Yurena Navarro<sup>a,b,c</sup>, Marta Herranz<sup>a,b,d</sup>,  
Emilio Bouza<sup>a,b,d,e</sup>, Darío García-de-Viedma<sup>a,b,c,d,\*</sup>

<sup>a</sup> Servicio de Microbiología y Enfermedades Infecciosas, Hospital General Universitario Gregorio Marañón, Spain

<sup>b</sup> Instituto de Investigación Sanitaria Gregorio Marañón, Madrid, Spain

<sup>c</sup> CEI Campus Moncloa, UCM-UPM, Madrid, Spain

<sup>d</sup> CIBER Enfermedades Respiratorias- CIBERES (CD06/06/0058), Spain

<sup>e</sup> Facultad de Medicina, Universidad Complutense de Madrid (UCM), Spain

## ARTICLE INFO

## Article history:

Received 3 July 2013

Received in revised form

20 September 2013

Accepted 28 September 2013

## Keywords:

Tuberculosis

MIRU-VNTR

Microevolution

## ABSTRACT

Clonal variants of *Mycobacterium tuberculosis* can emerge as a result of microevolution in a single host or after sequential infection of different hosts. The significance of subtle genotypic variations is still unknown. In three of the four loci analyzed from clonal variants differing in only one MIRU-VNTR locus, we found that the expression of the adjacent genes was modulated differently. These data highlight the potential advantages that acquisition of subtle variability may have in *M. tuberculosis*.

© 2013 Elsevier GmbH. All rights reserved.

## Introduction

Most infections by *Mycobacterium tuberculosis* (MTB) are considered clonally homogeneous; however, the application of standard genotyping tools such as IS6110 RFLP or MIRU-VNTR has revealed the existence of cases infected by clonal variants, with subtle differences between them. These clonal variants have been reported to emerge through microevolution from a parental strain, either within a single host or when a strain is sequentially transmitted to different hosts (Al-Hajj et al., 2010; Navarro et al., 2011; Warren et al., 2002; Cave et al., 2005; Pérez-Lago et al., 2011).

It is interesting to evaluate whether some of the subtle modifications caused by microevolution phenomena have a functional impact. Different studies have proved that entry of an IS6110 copy can interrupt a coding sequence or modulate the expression of a neighboring gene (Pérez-Lago et al., 2011; McEvoy et al., 2007; Sampson et al., 2001; Soto et al., 2004); therefore functional differences between RFLP-defined clonal variants are expected to be due to the specific variations caused by the presence or

absence of an IS6110 copy. Regarding microevolution detected by MIRU-VNTR, much less information is available on the potential functional impact of variations in the number of tandem repeats, likely as a result of genetic slippage (Lovett, 2004). Some intragenic MIRU-VNTR loci are considered to constitute sources of antigenic variability, and variations in the number of repeats can modify the structure and function of the proteins affected (Yindeeyoungyeon et al., 2009). With intergenic MIRU-VNTR loci, variations in the number of repeats can modulate expression of adjacent genes either through direct interference with the regulatory regions where they are located or because some repetitions include ribosomal or RNA polymerase-binding sites and can therefore promote transcription (Tantivitayakul et al., 2010).

Our aim in this study was to evaluate whether subtle differences in the number of repeats in a MIRU-VNTR locus between clonal variants emerging as a result of microevolution phenomena – and, therefore, sharing an isogenic background – can modify the expression of adjacent genes. Our hypothesis was that an advantage is expected for a nascent clonal variant appearing in a homogeneous bacterial population, whose representativeness has increased markedly until it can be detected in standard electrophoresis. The simplest explanation would be that the mentioned advantage was conferred by modification of the expression of an adjacent gene caused by the change in the number of repeats in a MIRU-VNTR locus.

\* Corresponding author at: Servicio de Microbiología y Enfermedades Infecciosas, Hospital Gregorio Marañón, C/ Dr. Esquerdo, 46, 28007 Madrid, Spain. Tel.: +34 91 4265104; fax: +34 91 5044906.

E-mail address: [dgvedma2@gmail.com](mailto:dgvedma2@gmail.com) (D. García-de-Viedma).

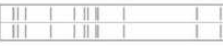
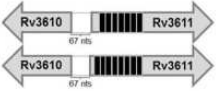


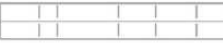
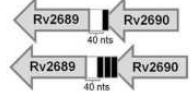
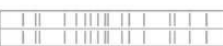

Microevolution event	Clonal variant	RFLPtype	MIRUtype	Microevolution rearrangement	MIRU involved (alias/locus)	Genes analyzed and function
Intrapatient	{ A B		233433442213437262213421 233433442213438262213421		<b>Qub26/4052</b>	<b>Rv3610</b> membrane-bound cell division protein <b>FtsH</b>
Intrapatient	{ C D		2523432422325252212423 2523432422425252212423		<b>VNTR52/3690</b>	<b>Rv3303/Rv3304</b> dihydroliipoamide dehydrogenase <b>lpdA</b> / conserved hypothetical protein
Intrapatient	{ E F		234333242232325262211423 234333242232325262213423		<b>MIRU27/2687</b>	<b>Rv2689</b> Conserved alanine, valine and glycine rich protein
Interpatient	{ G H		264223342123235162213423 264243342123235162213423		<b>MIRU10/960</b>	<b>Rv0861</b> DNA helicase <b>ercc3</b>

Fig. 1. Relevant features of the clonal variants analyzed.

## Results and Discussion

We therefore retrospectively sought pairs of clonal variants within the same patient or in patients who were sequentially infected by the same strain (in the same transmission chain). We selected those clonal variants differing in only one MIRU-VNTR locus and showing identical RFLP patterns, thus indicating a shared isogenic background. Eight clonal variants (from four microevolution events, three pairs of intrapatient variants (Navarro et al., 2011), and one pair of interpatient variants) fulfilled the selection criteria and were available for analysis (Fig. 1). The four loci involved in the microevolution of each pair of variants were QUB26, VNTR52, MIRU27, and MIRU10 (Fig. 1). For MIRU27 and MIRU10, the variants differed in two repeats, whereas for the remaining loci the corresponding variants differed only in one (Fig. 1).

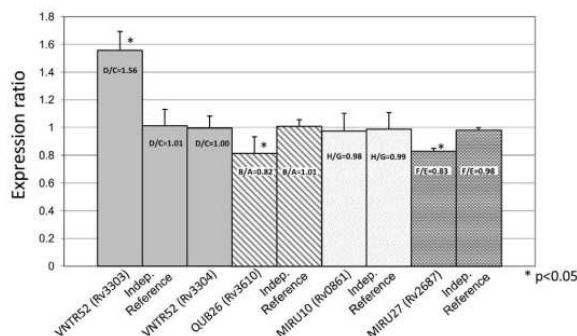
To evaluate whether expression of the genes adjacent to the MIRU-VNTR loci differed between the two clonal variants of each microevolution event, we carried out relative quantification assays using RT-PCR with specific probes. First, the clonal variants were grown in 7H9 liquid media for 3 weeks. Cell lysis and RNA extraction were performed as previously described (Pérez-Lago et al., 2011). RNA was purified using an RNeasy total RNA kit (Qiagen GmbH, Hilden, Germany) according to the manufacturer's instructions. Five micrograms of purified RNA was reversed-transcribed using the High Capacity RNA-to-cDNA Kit (Invitrogen, Life Technologies, CA, USA). This step was followed by qRT-PCR amplification (pre-incubation at 95 °C for 10 min and 40 cycles of 95 °C for 10 s, 56 °C for 10 s, and 72 °C for 1 s) using the LightCycler® FastStart DNA Master HybProbe kit (Roche). Primers and probes are described in Table 1. Efficiency was calculated using a standard curve for each gene analyzed. Quantitative values were calculated according to the following formula: ratio =  $E^{\Delta C_{T\text{target}}(\text{control-sample})} / E^{\Delta C_{T\text{ref}}(\text{control-sample})}$ , where ref corresponds to *sigA* gene (Pfaffl, 2001). The control corresponded arbitrarily to the variant with the lowest number of repeats. Each point was measured in duplicate, and controls with non-reverse-transcribed RNA were included to ensure the

absence of DNA in the samples. Five independent quantitative RT-PCR assays (from 2 to 3 independent RNA extractions) were performed for each variant. One-sample *t* test was used to determine whether the average expression ratios between the variants for each of the genes analyzed were statistically different from 1 ( $p < 0.05$ ). In all cases, the expression ratio between the clonal variants for an independent reference gene was not statistically different from 1, thus validating the assay (Fig. 2). The independent reference was a gene adjacent to a MIRU locus not involved in microevolution and sharing the same number of repetitions for the two variants analyzed. For the genes adjacent to the MIRU loci involved in microevolution, we detected statistically significant differences in expression values in three of the four events analyzed (those involving QUB26, VNTR52, and MIRU27). In two of these cases (QUB26 and VNTR52), the genes whose expression

**Table 1**  
Primers and probes used in the relative quantification assays.

Primers	
M10F	5'-CGAATGTCCACCTACC-3'
M10R	5'-GTAGCGGGAGTAACCTACCA-3'
MQ26FA	5'-CGTCAAGACGCGACAGAT-3'
MQ26RA	5'-ACTTGGTGATGACCTCTCCG-3'
M52F Rv3303	5'-GAGTTCGTGGACGCTATAC-3'
M52R Rv3303	5'-AACGACTCTCCAGGACCA-3'
M52F Rv3304	5'-GGACGAGAAGAACCTTGACC-3'
M52R Rv3304	5'-GTCCAAAACGTACAACACG-3'
M27F	5'-GTTTTCACCGCTACCAAGT-3'
M27R	5'-GTCCAGAGCCACGTAAAGC-3'
SigAFN	5'-AAGTCCGTAGTGGCTCC-3'
SigARN	5'-GATGGTCTGCTGCTAGTGT-3'
Probes	
M10S	5'-FAM-TGGCACTGTGGAATGCTCGC-BHQ-1-3'
MQ26SA	5'-FAM-ACGATCGCGAGCAACAGCTG-BHQ-1-3'
M52S Rv3303	5'-FAM-CAGGACCACTGCTGCCGTA-BHQ-1-3'
M52S Rv3304	5'-FAM-AGAAGATCCGATGCCGCTG-BHQ-1-3'
M27S	5'-FAM-ACCTGGACTGCGGCGAGTTG-BHQ-1-3'
SigASN	5'-FAM-CGCGAAGCGGCTACCAAG-BHQ-1-3'





**Fig. 2.** Relative expression ratios plus SEM (standard error mean) of genes adjacent to the MIRU-VNTR loci. The figure shows the value for the problem gene, which was adjacent to the MIRU-VNTR locus differing between the variants and for an independent reference gene (indep. reference) with an adjacent MIRU-VNTR locus identical for the two variants. The description of the variants A–H can be found in Fig. 1.

was affected (Rv3610 and Rv3303, respectively) encode proteins with enzymatic activity. It is therefore likely that changes in their expression have functional consequences.

For QUB26, which is included in the coding region of Rv3611, the variation in the number of repetitions has been described to affect the expression ratio of the adjacent gene Rv3610 (Tantivitayakul et al., 2010), although isogenic backgrounds had not been used in this analysis. We observed a difference of expression of Rv3610 between the variants of 0.82 (0.66–0.97;  $p < 0.05$ ) (Fig. 2). This gene encodes FtsH, a membrane-bound protein (Ito and Akiyama, 2005) whose expression is modulated by stress and that is upregulated in the presence of reactive oxygen and nitrogen intermediates and downregulated during the stationary phase and starvation. Overexpression of *FtsH* affects the growth and viability of MTB *in vitro* and *ex vivo* (Kiran et al., 2009).

Regarding VNR52, we detected a 1.56-fold difference (1.37–1.75;  $p < 0.05$ ) in one (Rv3303) of the two genes adjacent to the repetitions, but not in the other (Rv3304), indicating that the modulating role of the repetitions is not indiscriminate (Figs. 1 and 2). Rv3303 codes for LpdA, a member of the flavoprotein disulfide reductase family involved in the regulation of energy requirements under anaerobic conditions. The Rv3303c gene is involved in *in vivo* resistance to reactive oxygen intermediates (Akhtar et al., 2006), a key factor in MTB virulence; therefore, the difference in expression associated with the number of repeats in the MIRU52 locus is also consistent with potential functional significance.

Unfortunately, the function of the gene adjacent to the MIRU27 locus (Rv2689) – involved in the third event where differences of expression were observed (0.83; 0.81–0.86,  $p < 0.05$ ) (Fig. 2) – is unknown. Unlike the previous two events in which a functional scenario for the expression differences was feasible, it is not easy to contextualize the findings for this locus. Nevertheless, as Rv2689 is repressed more than 1.5 times in conditions mimicking the acidic phagosome environment (Fisher et al., 2002), modulation of its expression could still have some potential functional significance.

We could not detect differences in gene expression due to variations in MIRU10, probably because our standard *in vitro* culture might not have recreated the specific circumstances needed to identify the impact of MIRU10 variants on regulation.

In the three microevolution events where changes in the number of repeats in MIRU-VNTR loci modify the expression of adjacent genes, the effect is subtle. This is to be expected, since the differences between the variants corresponded to only 1–2 repeats. We pursued to give a snapshot of the potential variations in gene

expression that could be mediated by minor changes in MIRU loci and it is therefore out of the scope of our study to extend the experimental conditions in which the MIRU variants have been evaluated. However, it would be informative to try to mimic the *in vivo* infection, by evaluating these variants at different phases of growth or at different time points along the infection in macrophages.

Our approach to evaluating differences in expression within the chromosome is one of the strengths of our study. Other studies evaluate the role of variations in the repeats of MIRU-VNTR loci in gene expression by cloning the repeats upstream of reporter genes (Tantivitayakul et al., 2010; Akhtar et al., 2009), an approach that is not necessarily representative of the effect on expression expected in the chromosome.

The second strength of our study is that selected clonal variants share an isogenic background and standard genotyping only revealed differences in the MIRU-VNTR locus under analysis. Other studies have also proposed that the number of repeats in specific MIRU-VNTR loci modulates expression of adjacent genes. However, totally different and unrelated strains are compared, with extensive genomic differences other than those involving the MIRU-VNTR locus analyzed (Tantivitayakul et al., 2010; Akhtar et al., 2009; Refaya et al., 2012). We cannot rule out that the differences in gene expression found by these authors could also be affected by genetic factors other than the number of repeats of the adjacent locus and maybe for that reason some of the differences in expression measured by them are more marked than our subtle differences. Our study lacks these limitations; therefore, our expression data seem more likely to be associated with specific modifications in the number of repeats of the adjacent MIRU-VNTR loci. The fact that we found changes in gene expression associated with minor differences in the number of repetitions in MIRU-VNTR loci and that these differences were found for most of the loci analyzed alerts us to the potential significance of subtle variability in MTB, even though significance of the variations has generally been disregarded. Therefore, microevolution in MTB leads to the emergence of clonal variants that could be selected within the same patient or by infection of sequential hosts, most likely as a result of their hypothetical adaptive advantages.

## Acknowledgements

This work was supported by Fondo de Investigaciones Sanitarias (FIS S09/02205, PI12/02080). Laura Pérez held a Juan de la Cierva contract from the Ministerio de Ciencia e Innovación (JCI-2009-05713) and now holds a CIBERES contract (CP13/27/01). Research by Yurena Navarro was partly supported by a PICATA predoctoral fellowship (BE55/11) from the Moncloa Campus of International Excellence (UCM-UPM, Instituto de Investigación Sanitaria Gregorio Marañón). We acknowledge Jose María Bellón for his help with the statistical analysis. We are grateful to Thomas O'Boyle for proof-reading the manuscript.

## References

- Akhtar, P., Singh, S., Bifani, P., Kaur, S., Srivastava, B.S., Srivastava, R., 2009. Variable-number tandem repeat 3690 polymorphism in Indian clinical isolates of *Mycobacterium tuberculosis* and its influence on transcription. *J. Med. Microbiol.* 58, 798–805.
- Akhtar, P., Srivastava, S., Srivastava, A., Srivastava, M., Srivastava, B.S., Srivastava, R., 2006. Rv3303c of *Mycobacterium tuberculosis* protects tubercle bacilli against oxidative stress *in vivo* and contributes to virulence in mice. *Microbes Infect.* 8, 2855–2862.
- Al-Hajjaj, S.A., Akkerman, O., Parwati, I., al-Gamdi, S., Rahim, Z., van Soolingen, D., van Ingen, J., Supply, P., van der Zanden, A.G., 2010. Microevolution of *Mycobacterium tuberculosis* in a tuberculosis patient. *J. Clin. Microbiol.* 48, 3813–3816.
- Cave, M.D., Yang, Z.H., Stefanova, R., Fomukong, N., Ijaz, K., Bates, J., Eisenach, K.D., 2005. Epidemiologic import of tuberculosis cases whose isolates have similar but not identical IS6110 restriction fragment length polymorphism patterns. *J. Clin. Microbiol.* 43, 1228–1233.



- Fisher, M.A., Plikaytis, B.B., Shinnick, T.M., 2002. Microarray analysis of the *Mycobacterium tuberculosis* transcriptional response to the acidic conditions found in phagosomes. *J. Bacteriol.* 184, 4025–4032.
- Ito, K., Akiyama, Y., 2005. Cellular functions, mechanism of action, and regulation of FtsH protease. *Annu. Rev. Microbiol.* 59, 211–231.
- Kiran, M., Chauhan, A., Dziedzic, R., Maloney, K., Mukherji, S.K., Madiraju, M., Rajagopalan, M., 2009. *Mycobacterium tuberculosis* ftsH expression in response to stress and viability. *Tuberculosis (Edinb)* 89 (Suppl. (1)), S70–S73.
- Lovett, S.T., 2004. Encoded errors: mutations and rearrangements mediated by misalignment at repetitive DNA sequences. *Mol. Microbiol.* 52, 1243–1253.
- McEvoy, C.R., Falmer, A.A., Gey van Pittius, N.C., Victor, T.C., van Helden, P.D., Warren, R.M., 2007. The role of IS6110 in the evolution of *Mycobacterium tuberculosis*. *Tuberculosis (Edinb)* 87, 393–404.
- Navarro, Y., Herranz, M., Pérez-Lago, L., Martínez-Lirola, M., Ruiz-Serrano, M.J., Bouza, E., García de Viedma, D., 2011. Systematic survey of clonal complexity in tuberculosis at a populational level and detailed characterization of the isolates involved. *J. Clin. Microbiol.* 49, 4131–4137.
- Pérez-Lago, L., Herranz, M., Martínez-Lirola, M., Bouza, E., García de Viedma, D., 2011. Characterization of microevolution events in *Mycobacterium tuberculosis* strains involved in recent transmission clusters. *J. Clin. Microbiol.* 49, 3771–3776.
- Pfaffl, M.W., 2001. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res.* 29, e45.
- Refaya, A.K., Sivakumar, S., Sundararaman, B., Narayanan, S., 2012. Polymorphism in the RD1 locus and its effect on downstream genes among South Indian clinical isolates of *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Med. Microbiol.* 61, 1352–1359.
- Sampson, S., Warren, R., Richardson, M., van der Spuy, G., van Helden, P., 2001. IS6110 insertions in *Mycobacterium tuberculosis*: predominantly into coding regions. *J. Clin. Microbiol.* 39, 3423–3424.
- Soto, C.Y., Menéndez, M.C., Pérez, E., Samper, S., Gómez, A.B., García, M.J., Martín, C., 2004. IS6110 mediates increased transcription of the *phoP* virulence gene in a multidrug-resistant clinical isolate responsible for tuberculosis outbreaks. *J. Clin. Microbiol.* 42 (1), 212–219.
- Tantivitayakul, P., Panapruksachai, S., Billamas, P., Palittapongarnpim, P., 2010. Variable number of tandem repeat sequences act as regulatory elements in *Mycobacterium tuberculosis*. *Tuberculosis (Edinb)* 90, 311–318.
- Warren, R.M., van der Spuy, G.D., Richardson, M., Beyers, N., Booysen, C., Behr, M.A., van Helden, P.D., 2002. Evolution of the IS6110-based restriction fragment length polymorphism pattern during the transmission of *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Clin. Microbiol.* 40, 1277–1282.
- Yindeeyoungyeon, W., Likitvatanavong, S., Palittapongarnpim, P., 2009. Characterization of alpha-isopropylmalate synthases containing different copy numbers of tandem repeats in *Mycobacterium tuberculosis*. *BMC Microbiol.* 9, 122.



Contents lists available at ScienceDirect

## International Journal of Medical Microbiology

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/ijmm](http://www.elsevier.com/locate/ijmm)

## Short Communication

Unmasking subtle differences in the infectivity of microevolved *Mycobacterium tuberculosis* variants coinfecting the same patientYurena Navarro<sup>a,b,c,d,e</sup>, Laura Pérez-Lago<sup>a,b,e</sup>, Fernanda Sislema<sup>a,b</sup>, Marta Herranz<sup>a,b,e</sup>,  
Lucía de Juan<sup>c,d</sup>, Emilio Bouza<sup>a,b,e,f</sup>, Darío García-de-Viedma<sup>a,b,d,e,\*</sup><sup>a</sup> Servicio Microbiología Clínica y Enfermedades Infecciosas, Hospital General Universitario Gregorio Marañón, Madrid, Spain<sup>b</sup> Instituto de Investigación Sanitaria Gregorio Marañón, Madrid, Spain<sup>c</sup> Centro de Vigilancia Sanitaria Veterinaria (VISAVET), Universidad Complutense de Madrid, Avda. Puerta de Hierro s/n, 28040 Madrid, Spain<sup>d</sup> CEI Campus Moncloa, UCM-UPM, Madrid, Spain<sup>e</sup> CIBER Enfermedades Respiratorias, CIBERES, Spain<sup>f</sup> Departamento de Medicina, Facultad de Medicina, Universidad Complutense de Madrid, Madrid, Spain

## ARTICLE INFO

## Article history:

Received 13 August 2013

Received in revised form

24 September 2013

Accepted 3 October 2013

## Keywords:

Clonal variants

*Mycobacterium tuberculosis*

Infectivity

## ABSTRACT

Clonal variants of *Mycobacterium tuberculosis* can emerge as a result of microevolution phenomena. The functional significance of these subtle genetic rearrangements is normally disregarded. We show that clonal variants from two patients had different infective behaviours in some *in vitro* cellular infection models but not in others. Microevolution may have a subtle impact on infectivity, but specific experimental conditions are needed to unmask it.

© 2013 Elsevier GmbH. All rights reserved.

## Introduction

Some infections by *Mycobacterium tuberculosis* (MTB) are clonally complex; examples include reinfections, mixed infections, and compartmentalized infections (Cohen et al., 2012; Navarro et al., 2011). This complexity is not always due to different MTB strains. In some cases, a parental strain microevolves along a transmission chain or within a single episode of infection, leading to the emergence of clonal variants harbouring subtle differences with respect to the parental strain. These differences are revealed by standard genotyping techniques, namely, IS6110-RFLP and MIRU-VNTR (Al-Hajj et al., 2010). Few studies have investigated the functional significance of these subtle changes or other microevolutionary changes which could also be taking place in parallel in regions that are not revealed by standard genotyping techniques. Variations in the number of repetitions in specific MIRU-VNTR loci have been found to affect expression levels of neighbouring genes (Akhtar et al.,

2009; Tantivitayakul et al., 2010). Strains differing according to the presence or absence of an IS6110 copy located upstream of specific genes also show variations in the expression levels of these genes (Pérez-Lago et al., 2011). However, the potential impact on the infectivity of clonal variants of the subtle rearrangements associated with microevolution phenomena has rarely been investigated. In this study, we aimed to explore potential differences between the infectivity of clonal variants coinfecting two independent cases.

## Variants involved in compartmentalized infection

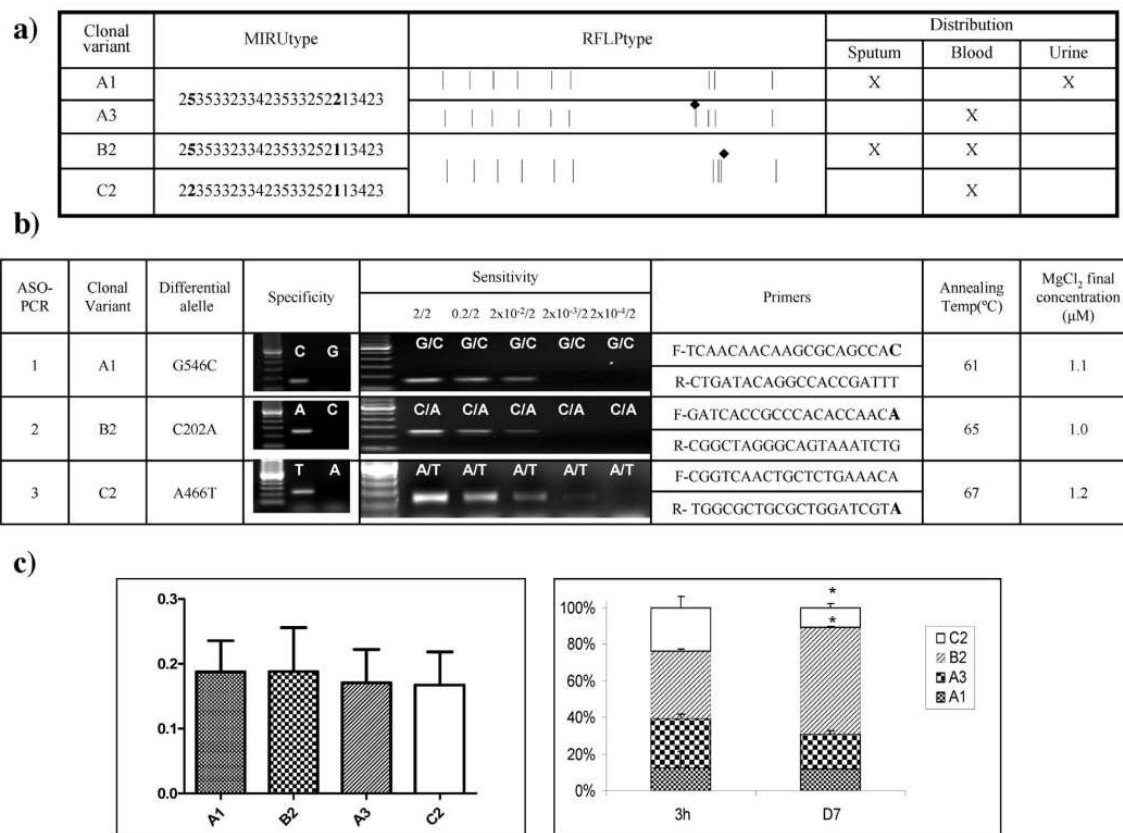
Differences in infectivity have been found between MTB strains involved in compartmentalized infections (García de Viedma et al., 2005), i.e., cases coinfecting by more than one MTB strain, each infecting a different compartment in the same patient. Therefore, if we aim to investigate differences in infectivity between clonal variants, one approach would be to select for analysis coinfecting MTB variants involved in compartmentalized infections.

Based on data from a study which systematically analyzed clonal complexity (Navarro et al., 2011), we selected a TB case (patient H) with a urothelial carcinoma and another previous TB episode, who showed at diagnosis a general health decay, fever, pain in lower limbs, lung and pleural nodules and kidney failure. In this case, an infrequently high number of coinfecting variants (A1, A3,

\* Corresponding author at: Servicio de Microbiología y Enfermedades Infecciosas, Hospital General Universitario Gregorio Marañón, Instituto de Investigación Sanitaria Gregorio Marañón, C/Dr Esquerdo, 46, 28007 Madrid, Spain.  
Tel.: +34 91 4265104; fax: +34 91 5044906.

E-mail address: [dgvedma2@gmail.com](mailto:dgvedma2@gmail.com) (D. García-de-Viedma).





**Fig. 1.** (a) Genotypic features of the clonal variants from the patient H. The distribution of the coinfecting variants is indicated. Bold numbers and black diamonds indicate changes in the MIRU-VNTR and RFLP patterns between the variants, respectively. (b) Features of the ASO-PCRs applied. Specificity was evaluated using 5 ng of DNA representative of each of the specific or nonspecific differential alleles. The expected sizes for the specific amplicons were as follows: ASO-PCR1, 181 bp; ASO-PCR2, 239 bp; and ASO-PCR3, 227 bp. The sensitivity of each PCR for identification of the homologous variant in the presence of nonhomologous variants was evaluated using a series of templates constituted by a fixed amount of DNA representative of a nonhomologous allele, together with decreasing amounts of the DNA representative of the homologous allele (the amounts in the figure are in ng). The forward primers for ASO-PCR1 and ASO-PCR2 were complementary for the noncoding strand, whereas the primer for ASO-PCR3 was complementary for the coding strand. The 3'-end nucleotide highlighted in bold corresponds to the nucleotide involved in allelic discrimination. (c) Infection of nonactivated THP-1 cells with the clonal variants; left panel: growth of the clonal variants in the THP-1 cells infected (at a multiplicity of infection (MOI) from 1 to 8) individually (expressed as the growth rate [y axis], i.e., the slope of the function of log<sub>10</sub> CFU values during the infection period [3 h to day 7]) using ANOVA analysis of three independent experiments; CFUs were counted at 3 h and days 1, 4 and 7; right panel: percentages of representativeness of the clonal variants, after simultaneous coinfection, as determined by MIRU-VNTR analysis of 118 (3 h) and 119 (day 7) independent colonies. Two independent experiments were carried out and Bonferroni correction was used for statistical analysis. Asterisks indicate statistical significance ( $p < 0.05$ ).

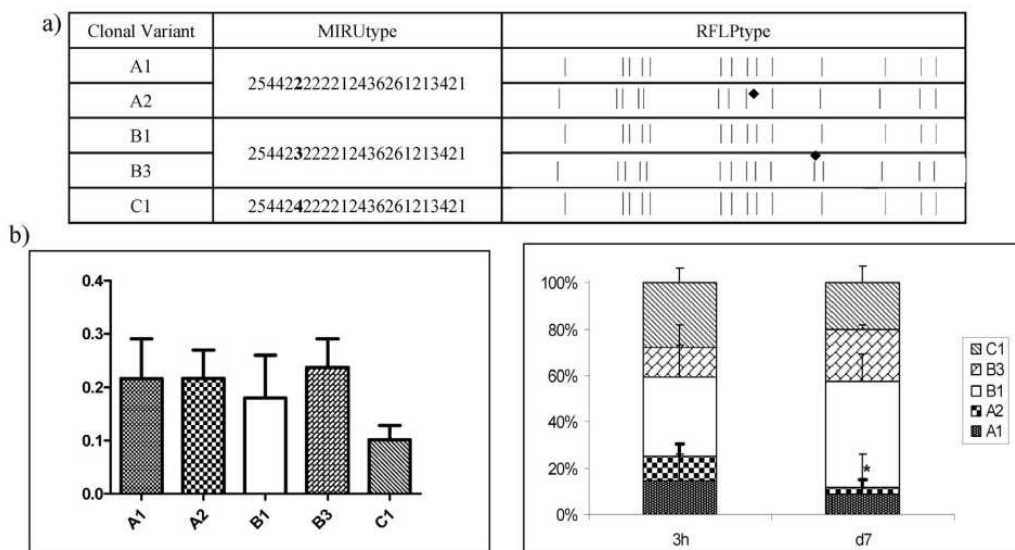
B2, and C2, all pansusceptible), revealed by standard genotyping (MIRU-VNTR and RFLP), were identified. In addition, these variants were not always isolated together from the same infected site (respiratory, blood, and urine), thus suggesting that infection was compartmentalized (Fig. 1a).

#### Confirmation of compartmentalization

If compartmentalization is to be used as a criterion for suspecting that the variants involved show different phenotypes (infective behaviour), we must confirm that compartmentalization is strict and that it is not the consequence of a lack of sensitivity when identifying variants at specific infected sites. Using whole genome sequencing data for coinfecting variants (data not shown), we designed a set of allele-specific oligonucleotide (ASO) polymerase chain reactions (PCRs) in order to ensure higher sensitivity when investigating the presence of the variants at the infected sites (Fig. 1b). An ASO-PCR could not be designed for variant A3 owing to the lack of specific single-nucleotide polymorphisms for

this variant. The specificity of each ASO-PCR (amplification only when the targeted variant was present), together with its analytical sensitivity, was measured using the DNAs representative of each of the alternative alleles alone or in mixtures at controlled proportions (a fixed amount of the alternative allele together with decreasing amounts of the allele homologous to the ASO-PCR) (Fig. 1b). The analytical sensitivity range was 0.02–0.002 ng (Fig. 1b).

ASO-PCRs 1, 2, and 3 were applied to investigate the presence of variants A1, B2, and C2 at the sites where they had not been identified by standard approaches (A1 in blood, B2 in urine, and C2 in sputum and urine, Fig. 1a). Variant A1 was also detected in blood, whereas variants B2 and C2 were absent from the sites where they had not been initially identified, thus confirming compartmentalization but depicting a new distribution of variants in the compartmentalized infection. These data showed the necessity of using highly sensitive tools to obtain an accurate snapshot of the true distribution of variants at the infected sites when a compartmentalized infection is detected.



**Fig. 2.** (a) Genotypic features of the clonal variants from patient 11. Bold numbers and black diamonds indicate changes in the MIRU-VNTR and RFLP patterns between the variants, respectively. (b) Infection of activated THP-1 cells with the clonal variants: left panel: growth of the clonal variants in the THP-1 cells infected (at a multiplicity of infection (MOI) from 1 to 10) individually (expressed as the growth rate [y axis], i.e., the slope of the function of log<sub>10</sub> CFU values during the infection period [3 h to day 7]) using ANOVA analysis of three independent experiments, CFUs were counted at 3 h and days 1, 4 and 7; right panel: percentages of representativeness of the clonal variants, after simultaneous coinfection, as determined by MIRU-VNTR analysis of 188 (3 h) and 174 (day 7) independent colonies. Two independent experiments were carried out and Bonferroni correction was used for statistical analysis. Asterisk indicates statistical significance ( $p < 0.05$ ).

### Functional evaluation of the variants involved in compartmentalization

After confirming that the infection in this patient was compartmentalized and having established the true distribution of variants, we evaluated whether infective behaviour differed between them. Considering the subtle genotypic rearrangements between the coinfecting variants, the potential infective differences were likely to be minor and might not be revealed in every infection model. Depending on the macrophage model applied, different outcomes of infection have been found for certain clonal variants of multidrug-resistant strains (Yokobori et al., 2013). With this consideration in mind, we applied four different modalities of an *in vitro* infection model based on the THP-1 line differentiated to macrophages by the addition of phorbol myristate acetate (PMA, Sigma, St. Louis, MO, USA; final concentration of 100 nM), as follows: (i) using either nonactivated or activated macrophages (by adding recombinant human interferon [IFN]  $\gamma$  [100 U/mL; Endogen], and (ii) infecting either in a standard way (with each variant independently) or competitively (with an inoculum in which all the coinfecting variants were included). Every infection assay using independent variants was repeated 3 times and the simultaneous coinfection assays were repeated twice.

We did not observe differences in the growth rate when independent infections with each of the variants were carried out (Fig. 1c) and CFU counts at 3 h post-infection were also equivalent between them. Nevertheless, we observed a statistically significant increase ( $p < 0.05$ ) in the representativeness of variant B2 (from 36.4% at 3 h to 58% at day 7), together with a reduction in variant C2 (from 23.7% at 3 h to 10.9% at day 7), which was restricted to the blood, when coinfecting nonactivated macrophages simultaneously with the variants (Fig. 1c). An equivalent although nonsignificant trend was observed when activated macrophages were used (data not shown). The proportion of clonal variants at 3 h post-infection was not different in relation to the inoculum.

These data support the need to evaluate infectivity using different models in order to ensure that infective differences do not go undetected. In addition, competitive coinfection assays seem to be more efficient for this purpose, probably because they reproduced the real clinical situation in which these variants were found, i.e., simultaneously in the same infection event.

### Functional evaluation of respiratory coinfecting variants

We were able to take advantage of the presence of cases with compartmentalized respiratory and extrapulmonary infection involving MTB clonal variants as a criterion to screen for variants that were candidates for differential infective behaviour. However, most of the cases coinfecting by clonal variants corresponded to pulmonary TB without extrapulmonary involvement. Therefore, our second aim was to evaluate whether different infectivity could also be found between clonal variants coinfecting patients with only respiratory TB. Patient 11, with another previous TB episode and cavitary lung lesions, was infected by an unusually high number of clonal variants (five, all pansusceptible) with single-locus variations (SLV) in the MIRU pattern and variations between the RFLP patterns (Fig. 2a) (Navarro et al., 2011).

The clonal variants from this patient were assayed following the same approach (four different modalities) for the *in vitro* THP-1 model. In the assay evaluating growth rate independently for each of the variants, no statistically significant differences were observed between them and CFU counts at 3 h post-infection were also equivalent between them (Fig. 2b) whereas in the coinfection assay, A2 was outcompeted by the other variants in activated macrophages (reduction from 10.6% at 3 h to 2.9% at day 7 of infection) (Fig. 2b). Additionally, C1 showed a diminished growth rate in the assay infecting individually with each variant and a reduction of its proportion in the coinfection assay (from 27.7% at 3 h to 20.2% at day 7 of infection). They were both non significant. The proportion of clonal variants at 3 h post-infection was not different in relation to the inoculum. These data again highlight the need to apply multiple



models to reveal the infective behaviour of clonal variants and show that microevolution occurring within the respiratory compartment is also related to the search for enhanced infectivity by the variants.

In summary, our aim to evaluate whether the subtle genetic rearrangements caused by inpatient microevolution events could lead to differences in infectivity was proved for some variants. These differences seem to involve intracellular replicative efficiency as no differences were detected between the variants in any model at the 3 h post infection stage, which rules out some role of the wall composition in relation to the efficiency of the variants to be engulfed by macrophages. It is difficult to further understand the significance of these subtle changes in the context of the compartmentalization of the first case. Of the two clonal variants involved in compartmentalization and restricted to blood, a different infective behaviour – in the percentage of representativity along competitive infection – was only observed in one. At the respiratory sites, we identified variants with a higher ability to infect macrophages and variants that did not have this ability. These different infective behaviours can be result of different strategies of survival as discussed elsewhere (Brites and Gagneux, 2012). A higher growth rate would increase the ability of the clonal variant to form lung cavities and be transmitted but, in the other hand, a decreased infectivity could have a greater evolutionary advantage in terms of assuring the host and, therefore, bacterial survival.

The subtle genetic rearrangements caused by microevolution phenomena may have a role in the infectivity of some emerging clonal variants. Differential infective behaviour can be found not only between clonal variants which are distributed differently at pulmonary and extrapulmonary sites, but also between others still coexisting in the lung. Models of infection should be applied in conditions additional to the standard ones to allow us to uncover masked infectivity phenotypes in MTB. Successfully detection of differences of infectivity between MTB clonal variants will enable us to understand the role that microevolution could play in the disease.

#### Acknowledgements

This work was supported by Fondo de Investigaciones Sanitarias (FIS S09/02205, PI12/02080). Research by Yurena Navarro

was partly supported by a PICATA predoctoral fellowship (BE55/11) from the Moncloa Campus of International Excellence (UCM-UPM, Instituto de Investigación Sanitaria Gregorio Marañón). L. P. held a Juan de la Cierva contract from the Ministerio de Ciencia e Innovación (JCI-2009-05713) and now holds a contract from CIBERES (Ref CP13/27/01). FSE was supported by a fellowship from AECID (CP-13-27-01) and by a Grant for International Cooperation Projects by Instituto de Investigación Sanitaria Gregorio Marañón (FIBHGM-PRMGDV-2013). We acknowledge Jose María Bellón for his help with the statistical analysis. We are grateful to Thomas O'Boyle for proofreading the manuscript.

#### References

- Akhtar, P., Singh, S., Bifani, P., Kaur, S., Srivastava, B.S., Srivastava, R., 2009. Variable-number tandem repeat 3690 polymorphism in Indian clinical isolates of *Mycobacterium tuberculosis* and its influence on transcription. *J. Med. Microbiol.* 58, 798–805.
- Al-Hajj, S.A., Akkerman, O., Parwati, I., al-Gamdi, S., Rahim, Z., van Soolingen, D., van Ingen, J., Supply, P., van der Zanden, A.G., 2010. Microevolution of *Mycobacterium tuberculosis* in a tuberculosis patient. *J. Clin. Microbiol.* 48, 3813–3816.
- Brites, D., Gagneux, S., 2012. Old and new selective pressures on *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect. Genet. Evol.* 12, 678–685.
- Cohen, T., van Helden, P.D., Wilson, D., Colijn, C., McLaughlin, M.M., Abubakar, I., Warren, R.M., 2012. Mixed-strain *Mycobacterium tuberculosis* infections and the implications for tuberculosis treatment and control. *Clin. Microbiol. Rev.* 25, 708–719.
- García de Viedma, D., Lorenzo, G., Cardona, P.J., Rodríguez, N.A., Gordillo, S., Serrano, M.J., Bouza, E., 2005. Association between the infectivity of *Mycobacterium tuberculosis* strains and their efficiency for extrapulmonary infection. *J. Infect. Dis.* 192, 2059–2065.
- Navarro, Y., Herranz, M., Perez-Lago, L., Martínez Lirio, M., Ruiz-Serrano, M.J., Bouza, E., García de Viedma, D., 2011. Systematic survey of clonal complexity in tuberculosis at a population level and detailed characterization of the isolates involved. *J. Clin. Microbiol.* 49, 4131–4137.
- Perez-Lago, L., Herranz, M., Lirio, M.M., Bouza, E., García de Viedma, D., 2011. Characterization of microevolution events in *Mycobacterium tuberculosis* strains involved in recent transmission clusters. *J. Clin. Microbiol.* 49, 3771–3776.
- Tantivitayakul, P., Panapruksachai, S., Billamas, P., Palittapongarnpim, P., 2010. Variable number of tandem repeat sequences act as regulatory elements in *Mycobacterium tuberculosis*. *Tuberculosis (Edinb.)* 90, 311–318.
- Yokobori, N., Lopez, B., Geffner, L., Sabio, Y.G.C., Schierloh, P., Barrera, L., de la Barrera, S., Sakai, S., Kawamura, I., Mitsuyama, M., Ritacco, V., Del Carmen Sasiain, M., 2013. Two genetically related multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* strains induce divergent outcomes of infection in two human macrophage models. *Infect. Genet. Evol.* 16C, 151–156.

## **CAPÍTULO II**

### **Estudio exhaustivo de eventos de complejidad clonal en casos clínicos seleccionados**

---



De modo complementario a los estudios presentados en el capítulo I, que se dirigen al rastreo y análisis de la complejidad clonal en tuberculosis humana de modo sistemático y atendiendo a los aspectos generales de su impacto funcional, es oportuno asimismo ubicar el estudio de estos eventos en el escenario de casos clínicos singulares. La finalidad de este planteamiento es, por un lado, enfocar el problema de las infecciones complejas hacia el contexto clínico del paciente y valorar cómo pueden repercutir en aspectos diagnósticos y terapéuticos. Por otro lado, el análisis del comportamiento de la infección en pacientes seleccionados permite convertirlos en un modelo de observación del que obtener una información que no es posible adquirir a partir de los estudios poblacionales.

El primero de los tres estudios dirigidos al análisis exhaustivo de casos seleccionados corresponde a una mujer con infección mixta por dos cepas de MTB, una sensible y otra multirresistente (MDR). Inicialmente, esta situación de complejidad clonal impactó sobre los resultados de los ensayos de sensibilidad antibiótica y de identificación genotípica de resistencias, conduciendo a resultados indeterminados y contradictorios que dificultaron su interpretación. Únicamente la actitud de considerar el caso como una posible infección compleja, condujo a sospechar una infección mixta por cepas con distinto perfil de sensibilidad antibiótica. La aplicación de MIRU-VNTR en las muestras de este paciente permitió confirmar dicha infección mixta, además de desvelar una marcada infrarrepresentación de la cepa MDR. Estudios de genotipado sobre colonias individuales confirmaron que la cepa MDR estaba infrarrepresentada, en el límite de detección de diversas técnicas diagnósticas. Ensayos de *fitness* mostraron una inferioridad de la cepa MDR con respecto a la sensible, que podía explicar su mala recuperación en cultivo líquido. Gracias al estudio de epidemiología molecular llevado a cabo en la población del caso, se pudo documentar que la cepa MDR correspondía a un contacto cercano de la paciente diagnosticado tres años antes, mientras que la cepa sensible se encontraba circulando activamente en la población. La integración de análisis genotípico individual y poblacional, con los datos clínicos y epidemiológicos del caso permitió llegar a la conclusión de que la infección mixta fue consecuencia de la infección reciente con una cepa sensible que propició la reactivación de una infección latente por una cepa MDR.

Los dos casos restantes comparten interés alrededor de la segunda modalidad de infección compleja, la infección con variantes clonales. El interés de ambos casos es debido a que ilustran dos situaciones relevantes alrededor del estudio de la microevolución: i) una adquisición de variabilidad por parte de una cepa de MTB mayor



de la esperada y ii) una ausencia de adquisición de variabilidad a pesar de oportunidades evidentes para la existencia de fenómenos de microevolución.

El primero de estos dos casos corresponde a un paciente con una reactivación por MTB. En el segundo episodio aislamos una variante generada a partir de la cepa de MTB responsable del primer episodio. Ambas variantes diferían tanto en el patrón de RFLP-IS6110 como en el MIRUtipo y acumulaban asimismo variabilidad en SNPs, revelada por secuenciación de genoma completo. Dicha secuenciación permitió, además, obtener el escenario real de aparición de las variantes, observándose que cada variante había evolucionado de manera independiente de una cepa parental. Adicionalmente, una tercera variante, que no había sido detectada en las muestras clínicas, emergió por microevolución durante un ensayo de infección *in vitro* en macrófagos. El genotipado y la secuenciación del genoma completo, permitió detectar a partir de cuál de las dos variantes clínicas había microevolucionado y estudios *in vitro* demostraron cómo la nueva variante tenía un *fitness* superior a su cepa parental. Todo ello demostraba la marcada tendencia a microevolucionar de esta cepa.

El material aportado por este paciente, tres variantes clonales diferentes completamente caracterizadas genotípicamente, permitió abordar un estudio exhaustivo de expresión de los entornos genéticos afectados por la variabilidad adquirida, pudiéndose demostrar diferencias de expresión entre las variantes. Los ensayos de infectividad estándar realizados tanto en cultivos celulares como en ratones Balb/c no manifestaron diferencias significativas entre las variantes, sin embargo, el modelo de infección competitiva en ratón desveló una mayor replicación de la variante del segundo episodio, tanto en pulmón como en bazo.

El segundo caso analizado en el entorno de la microevolución correspondía a un paciente que estuvo infectado persistentemente (8 años) por una cepa Beijing, la misma que había sido responsable de un brote de grandes dimensiones en Gran Canaria. El caso proporcionó una ocasión única para estudiar los posibles cambios genómicos por microevolución que se pueden generar en la infección por MTB cuando se dan claras oportunidades (infección prolongada en el seno de una mala adherencia terapéutica que condujo a un tratamiento intermitente). Inesperadamente, no se identificó ninguna variación, ni en cuanto al patrón de RFLP-IS6110, ni de MIRU-VNTR, ni en cuanto a la adquisición de mutaciones de resistencia. Incluso el análisis exhaustivo por secuenciación de genoma completo fue incapaz de identificar algún SNP a lo largo de todo el período de infección.

De modo colateral, al margen del estudio específico de microevolución, este caso permitió analizar las suposiciones asignadas a la infección por cepas del linaje Beijing, consideradas de alta virulencia y transmisibilidad. Esta cepa desafió los supuestos existentes sobre este linaje, puesto que mostró una tasa de crecimiento únicamente moderada en macrófagos y no se detectaron casos secundarios ocasionados por el caso persistentemente infectado por la cepa en estudio.

En conclusión, el estudio de casos clínicos singulares recogidos en este capítulo nos permite concluir que la infección mixta debe de considerarse para asegurar un correcto manejo diagnóstico y terapéutico de los pacientes, incluso en entornos de moderada incidencia y baja prevalencia de resistencias. Asimismo, el análisis de fenómenos de microevolución en pacientes concretos nos ha conducido a identificar la adquisición de una marcada variabilidad en situaciones que no la favorecen especialmente y asimismo, la ausencia total de adquisición de variabilidad en circunstancias que la favorecen. Esto indica la probable participación de factores propios de cada cepa que determinan su tendencia a microevolucionar. Además, los estudios de expresión y de análisis comparativo de infectividad, tanto en modelos *in vitro* como *in vivo*, a partir del material recogido de estos casos singulares han desvelado que los cambios genómicos adquiridos por microevolución pueden asociarse a consecuencias funcionales que pueden suponer una ventaja adaptativa en distintas etapas de la infección. Por último el estudio de uno de estos casos nos ha permitido, colateralmente, demostrar que la mayor aptitud infectiva y transmisibilidad asumida para los aislados Beijing de MTB no siempre se cumple.



## LETTERS

identified; 2) this finding adds clues to the identification of potential new co-infections occurring in HIV-infected persons; and 3) this finding underlines the need to investigate the virome content of blood samples in a research context of new microbes as potential threats for transfusion. Further studies aimed at exploring genetic diversity and natural history of gemycircularviruses in human hosts are needed.

This work was supported by grant APR 2013.10 from the Établissement Français du Sang (Paris, France) and by the Méditerranée-Infection foundation.

## References

1. Yu X, Li B, Fu Y, Jiang D, Ghabrial SA, Li G, et al. A geminivirus-related DNA mycovirus that confers hypovirulence to a plant pathogenic fungus. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010;107:8387–92. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.0913535107>
2. Rosario K, Dayaram A, Marinov M, Ware J, Kraberger S, Staiton D, et al. Diverse circular ssDNA viruses discovered in dragonflies (Odonata: Epiprocta). *J Gen Virol*. 2012;93:2668–81. <http://dx.doi.org/10.1099/vir.0.045948-0>
3. Dayaram A, Opong A, Jaschke A, Hadfield J, Baschiera M, Dobson RC, et al. Molecular characterization of a novel cassava associated circular ssDNA virus. *Virus Res*. 2012;166:130–5. <http://dx.doi.org/10.1016/j.virusres.2012.03.009>
4. Sikorski A, Massaro M, Kraberger S, Young LM, Smalley D, Martin DP, et al. Novel myco-like DNA viruses discovered in the faecal matter of various animals. *Virus Res*. 2013;177:209–16. <http://dx.doi.org/10.1016/j.virusres.2013.08.008>
5. Ng TF, Chen LF, Zhou Y, Shapiro B, Stiller M, Heintzman PD, et al. Preservation of viral genomes in 700-y-old caribou feces from a subarctic ice patch. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2014;111:16842–7. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.1410429111>
6. Kraberger S, Argüello-Astorga GR, Greenfield LG, Galilee C, Law D, Martin DP, et al. Characterisation of a diverse range of circular replication-associated protein encoding DNA viruses recovered from a sewage treatment oxidation pond. *Infect Genet Evol*. 2015;31:73–86. <http://dx.doi.org/10.1016/j.meegid.2015.01.001>
7. Kraberger S, Farkas K, Bernardo P, Booker C, Argüello-Astorga GR, Mesléard F, et al. Identification of novel *Bromus*- and *Trifolium*-associated circular DNA viruses. *Arch Virol*. 2015;160:1303–11. <http://dx.doi.org/10.1007/s00705-015-2358-6>
8. Lamberto I, Gunst K, Müller H, zur Hauen H, de Villiers EM. Mycovirus-like DNA virus sequences from cattle serum and human brain samples from multiple sclerosis patients. *Genome Announc*. 2014;2: pii: e00848–14. <http://dx.doi.org/10.1128/genomeA.00848-14>
9. Phan TG, Mori D, Deng X, Rajindrajith S, Ranawaka U, Fan Ng TF, et al. Small circular single stranded DNA viral genomes in unexplained cases of human encephalitis, diarrhea, and in untreated sewage. *Virology*. 2015;482:98–104. <http://dx.doi.org/10.1016/j.virol.2015.03.011>
10. Biagini P, Touinssi M, Galicher V, de Micco P. KIs virus and blood donors, France. *Emerg Infect Dis*. 2012;18:1374–5. <http://dx.doi.org/10.3201/eid1808.120442>

Address for correspondence: Philippe Biagini, Equipe “Emergence et co-évolution virale,” UMR 7268 ADES, Aix-Marseille Université, EFS, CNRS, 27 Blvd Jean Moulin, 13005 Marseille, France; email: [philippe.biagini@efs.sante.fr](mailto:philippe.biagini@efs.sante.fr)

## Co-infection with Drug-Susceptible and Reactivated Latent Multidrug-Resistant *Mycobacterium tuberculosis*

Laura Pérez-Lago, Miguel Martínez Lirola, Yurena Navarro, Marta Herranz, María Jesús Ruiz-Serrano, Emilio Bouza, Darío García-de-Viedma

Author affiliations: Gregorio Marañón University General Hospital, Madrid, Spain (L. Pérez-Lago, Y. Navarro, M. Herranz, M.J. Ruiz-Serrano, E. Bouza, D. García-de-Viedma); Gregorio Marañón Health Research Institute, Madrid (L. Pérez-Lago, Y. Navarro, M. Herranz, M.J. Ruiz-Serrano, E. Bouza, D. García-de-Viedma); Centro de Investigación Biomédica en Red en Enfermedades Respiratorias, Madrid (L. Pérez-Lago, Y. Navarro, M. Herranz, M.J. Ruiz-Serrano, E. Bouza, D. García-de-Viedma); Torrecárdenas Hospital, Almería, Spain (M. Martínez Lirola); Complutense University of Madrid, Spain (E. Bouza); Mondloa International Campus of Excellence, Complutense University-Politécnica University, Madrid (Y. Navarro, D. García-de-Viedma)

DOI: <http://dx.doi.org/10.3201/eid2111.150683>

**To the Editor:** Genotyping of *Mycobacterium tuberculosis* (MTB) has identified mixed infections involving >1 MTB strain (1–4), which are clinically relevant when different susceptibility patterns are involved (4–7). We describe a tuberculosis (TB) case-patient with mixed infection in an area of moderate incidence. In a low-resistance setting (monoresistance 4.6%; multiresistance 1.7%), 1 of the strains was drug susceptible and the other was multidrug-resistant (MDR). Molecular fingerprinting and epidemiologic research revealed that the infection corresponded to a recent infection by a susceptible strain and reactivation of an MDR TB strain. The patient was an HIV-negative woman, 47 years of age, who had immigrated to Spain from Romania and had been living in Almería for >3 years. TB was diagnosed in May 2014; she had experienced symptoms for 2 months. Her diagnosis was confirmed 3 years after being studied in Almería as a close contact of her husband, also from Romania, who had tested positive for MDR TB (resistant to rifampin and isoniazid). When she was observed in the contact trace, she tested positive for purified protein derivative, had been vaccinated against the *M. bovis* bacillus Calmette-Guérin strain, and had no radiologic findings or clinical symptoms. Based on the susceptibility profile of her husband, prophylaxis was not prescribed. Her husband adhered to anti-TB treatment for 20 months; all microbiological control test results had been negative since 2 months after starting therapy.

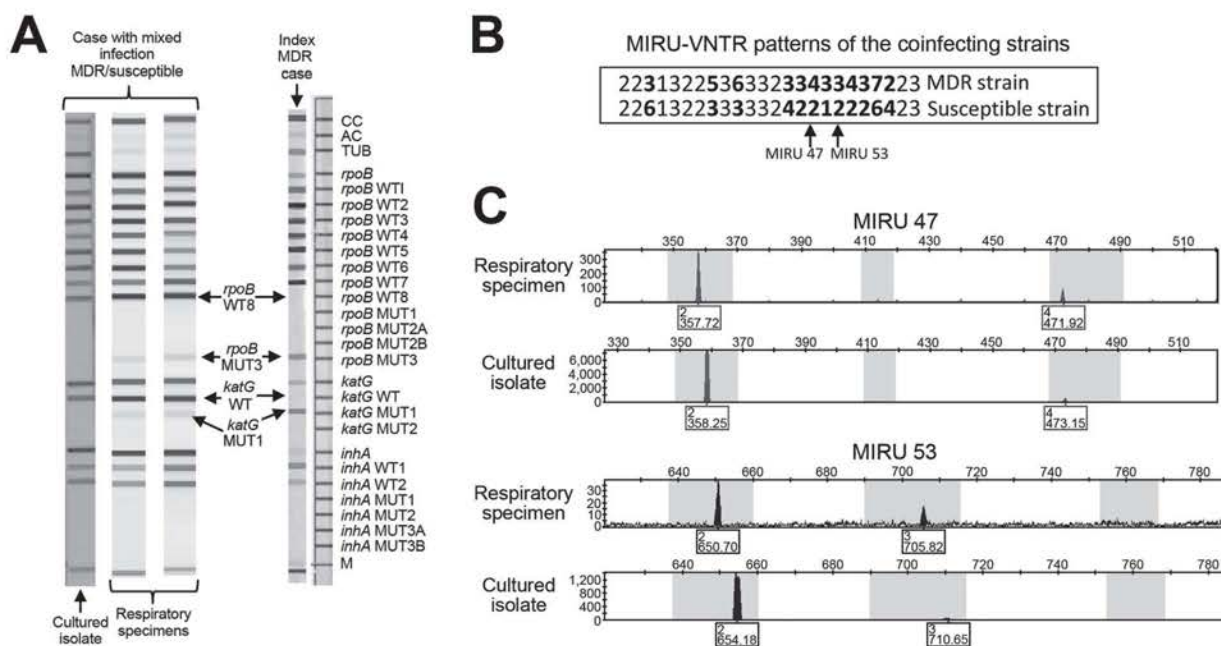
Because her infection was thought to originate from previous contact with an MDR TB case-patient, we assessed her sputum samples for resistance using GenoType-MTBDR-plus (Hain-Lifescience, Nehren, Rhineland-Palatinate, Germany). The test showed hybridization with the same mutant probes (*rpoB*-MUT3; *katG*-MUT1) as those of her husband, the assumed index MDR TB case-patient (Figure, panel A). The pattern was indeterminate because the hybridization for the mutant probes was faint, and intense hybridization was observed for all the *wt* probes (Figure, panel A). Results suggested the simultaneous presence of an MDR strain and a susceptible strain in a respiratory specimen. The presence of the MDR TB strain was confirmed by the phenotypic antibiogram in a BBL MGIT mycobacteria growth indicator tube (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA) after the isolate had been cultured. GeneXpert (Cepheid, Sunnyvale, CA, USA) was used to analyze 2 respiratory specimens. Results indicated susceptibility to rifampin, revealing the limitations of this test: the use of probes targeting the *wt* sequences failed to detect resistant strains that coexist with a susceptible strain (7).

To ascertain the likelihood of 2 co-infecting strains, we analyzed the specimen and the cultured isolate by mycobacterial interspersed repetitive unit-variable number

tandem repeat (MIRU-VNTR), which is highly sensitive for detecting complex infections (8,9). Double alleles were found at 12 loci (Figure, panel B), confirming co-infection.

Peaks in the electropherograms suggested that 1 of the 2 strains was under-represented and its proportion was lower in the cultured isolates (Figure, panel C), indicating that culturing diminished its representation of the minority strain. This finding was consistent with the inability of the GenoType test to detect the MDR strain when applied to the cultured isolate (Figure, panel A). We also detected lower fitness for the MDR strain compared to the susceptible strain ( $p < 0.01$ ) (online Technical Appendix Table, <http://wwwnc.cdc.gov/EID/article/21/11/15-0683-Techapp1.pdf>).

Proportions of the resistant and susceptible strains were determined by plating on Middlebrook 7H11 +/- isoniazid (0.4 mL/mL) and counting single colonies. Because 2% of the colonies were of the resistant strain, we separated the strains and concluded: 1) the strain cultured in the presence of an antimicrobial drug coincided in the population exclusively with the MDR strain from the husband (as shown by MIRU-VNTR); and 2) the co-infecting MDR strain was a minority strain that was under-represented in the cultured isolate.



**Figure.** Identification of co-infection with drug-susceptible and reactivated latent multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* (MDR TB). A) Genotype of multidrug-resistant tuberculosis (MDR TB) and results for the MDR TB index patient and for 2 respiratory specimens and 1 cultured isolate from the case-patient who had a mixed MDR/susceptible infection. The same indeterminate intense-wt/faint mutant pattern test was repeated by using another 2 specimens. B) Mycobacterial interspersed repetitive units-variable number tandem repeat (MIRU-VNTR) types for the 2 strains involved in the co-infection. The results from the loci in which the analysis yielded double alleles are in bold text. Values for MIRU47 and 53 are indicated. C) Selection of 2 electropherograms representative of 2 (MIRU47 and 53) of the 12 loci with double alleles caused by mixed infection. Data that were obtained from direct analysis of a respiratory specimen or from a cultured isolate are shown.



## LETTERS

To analyze the origin of the susceptible strain, we investigated its MIRU-VNTR type in the population-based molecular epidemiology survey (10) and found another 4 cases (from 2008, 2011 [2 cases], and 2014). Three case-patients had emigrated from Romania, and all 5 case-patients lived in the same area of Almería. These data indicated that the susceptible strain was circulating in the geographic/epidemiological context of the current case-patient before and when she tested positive for that strain; therefore, she likely acquired the susceptible strain through recent transmission.

The presence of susceptible and resistant strains in a patient should be considered even in moderate incidence settings and where resistance rates are not high. Under-detection of these cases could lead to misinterpretation when MDR became apparent after treatment of susceptible strains. Diagnostic laboratories could easily screen for mixed infections by applying MIRU-VNTR. However, only by integrating clonal analysis, refined molecular typing, and epidemiologic data from universal genotyping programs can we clarify the reasons underlying complex MTB infections. For this case-patient, a recent infection with a susceptible strain coincided with or could have triggered reactivation of a latent infection involving an MDR strain acquired through close contact years previously. We emphasize the alteration of the true clonal complexity of an infection induced by culturing specimens and that some commercial tests do not identify complex MTB infections. These findings are particularly relevant when the infection involves resistant strains such as those found in this case-patient.

# Acknowledgment

We thank Thomas O'Boyle for proofreading the manuscript.

This study was supported by Plan Estatal de I+D+I 2013-2016, ISCIII (PI 12/02080; 13/01207) and Fondo Europeo de Desarrollo Regional FEDER "Una manera de hacer Europa."

# References

1. Warren RM, Victor TC, Streicher EM, Richardson M, Beyers N, Gey van Pittius NC, et al. Patients with active tuberculosis often have different strains in the same sputum specimen. *Am J Respir Crit Care Med*. 2004;169:610-4. <http://dx.doi.org/10.1164/rccm.200305-714OC>
2. Shin SS, Modongo C, Ncube R, Sepako E, Klausner JD, Zetola NM. Advanced immune suppression is associated with increased prevalence of mixed-strain *Mycobacterium tuberculosis* infections among persons at high risk for drug-resistant tuberculosis in Botswana. *J Infect Dis*. 2015;211:347-51. <http://dx.doi.org/10.1093/infdis/jiu421>
3. Dickman KR, Nabyonga L, Kateete DP, Katabazi FA, Asiimwe BB, Mayanja HK, et al. Detection of multiple strains of *Mycobacterium tuberculosis* using MIRU-VNTR in patients with pulmonary tuberculosis in Kampala, Uganda. *BMC Infect Dis*. 2010;10:349. <http://dx.doi.org/10.1186/1471-2334-10-349>
4. Niemann S, Richter E, Rüsche-Gerdes S, Schlaak M, Greinert U. Double infection with a resistant and a multidrug-resistant strain of *Mycobacterium tuberculosis*. *Emerg Infect Dis*. 2000;6:548-51. <http://dx.doi.org/10.3201/eid0605.000518>
5. Hingley-Wilson SM, Casey R, Connell D, Bremang S, Evans JT, Hawkey PM, et al. Undetected multidrug-resistant tuberculosis amplified by first-line therapy in mixed infection. *Emerg Infect Dis*. 2013;19:1138-41. <http://dx.doi.org/10.3201/eid1907.130313>
6. Mendez MP, Landon ME, McCloud MK, Davidson P, Christensen PJ. Co-infection with pansensitive and multidrug-resistant strains of *Mycobacterium tuberculosis*. *Emerg Infect Dis*. 2009;15:578-80. <http://dx.doi.org/10.3201/eid1504.080592>
7. Zetola NM, Shin SS, Tumedji KA, Moeti K, Ncube R, Nicol M, et al. Mixed *Mycobacterium tuberculosis* complex infections and false-negative results for rifampin resistance by GeneXpert MTB/RIF are associated with poor clinical outcomes. *J Clin Microbiol*. 2014;52:2422-9. <http://dx.doi.org/10.1128/JCM.02489-13>
8. García de Viedma D, Alonso Rodríguez N, Andres S, Ruiz Serrano MJ, Bouza E. Characterization of clonal complexity in tuberculosis by mycobacterial interspersed repetitive unit-variable-number tandem repeat typing. *J Clin Microbiol*. 2005;43:5660-4. <http://dx.doi.org/10.1128/JCM.43.11.5660-5664.2005>
9. Supply P, Lesjean S, Savine E, Kremer K, van Soolingen D, Locht C. Automated high-throughput genotyping for study of global epidemiology of *Mycobacterium tuberculosis* based on mycobacterial interspersed repetitive units. *J Clin Microbiol*. 2001;39:3563-71. <http://dx.doi.org/10.1128/JCM.39.10.3563-3571.2001>
10. Alonso-Rodríguez N, Martínez-Lirola M, Sánchez ML, Herranz M, Penafiel T, Bonillo Mdel C, et al. Prospective universal application of mycobacterial interspersed repetitive-unit-variable-number tandem-repeat genotyping to characterize *Mycobacterium tuberculosis* isolates for fast identification of clustered and orphan cases. *J Clin Microbiol*. 2009;47:2026-32. <http://dx.doi.org/10.1128/JCM.02308-08>

Address for correspondence: Darío García de Viedma, Servicio de Microbiología y Enfermedades Infecciosas, Hospital General Universitario Gregorio Marañón, Instituto de Investigación Sanitaria Gregorio Marañón, C/Dr Esquerdo, 46, 28007 Madrid, Spain; email:dgriedma2@gmail.com

## Sensitivity to Polymyxin B in El Tor *Vibrio cholerae* O1 Strain, Kolkata, India

Prosenjit Samanta, Priyanka Ghosh, Goutam Chowdhury, Thandavaryan Ramamurthy, Asish K. Mukhopadhyay

Author affiliation: National Institute of Cholera and Enteric Diseases, Kolkata, India

DOI: <http://dx.doi.org/10.3201/eid2111.150762>

**To the Editor:** The epidemiology of cholera, especially in Africa and Asia, has periodically changed in subtle ways (1). The recent cholera epidemic in Haiti, a Caribbean country with no cholera cases in decades, affected >500,000 persons, caused ≈8,000 deaths, and brought this illness to the forefront of Haitian public health concerns

**Technical Appendix.** In vitro fitness of the multidrug-resistant and susceptible *Mycobacterium tuberculosis* strains involved in the mixed infection.

**Technical Appendix Table. †**

Strains	Lag phase (hours to positive threshold [75 GU])	Growth rate (hours for the 3000–4000 GU increase)
Susceptible strain	220.17 ± 14.85	28 ± 1.13
MDR strain	289.67 ± 6.12	46.4 ± 2.26

\*MGIT960 culture system, Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA.

†Mean and standard deviation values were calculated from data from 3 independent experiments. GU: growth units.

Submitted 09/09/2015

# **In-depth characterization of *Mycobacterium tuberculosis* clonal variants from a recurrent patient**

**Yurena Navarro<sup>1,2,3,4,5</sup>, Marta Herranz<sup>1,2,3</sup>, Laura Pérez-Lago<sup>1,2,3</sup>, Iñaki Comas<sup>6,7</sup>, Javier Sicilia<sup>2,8</sup>, María Mazariegos<sup>5</sup>, Emilio Bouza<sup>1,2,3,9</sup>, Darío García-de-Viedma<sup>1,2,3,4\*</sup>**

*1 Servicio Microbiología Clínica y Enfermedades Infecciosas, Hospital General Universitario Gregorio Marañón, Madrid, Spain*

*2 Instituto de Investigación Sanitaria Gregorio Marañón, Madrid, Spain*

*3 CIBER Enfermedades respiratorias, CIBERES*

*4 CEI Campus Moncloa, UCM-UPM, Madrid, Spain*

*5 Centro de Vigilancia Sanitaria Veterinaria (VISAVET), Universidad Complutense Madrid, 28040 Madrid, Spain*

*6 Unidad Mixta Genómica y Salud, Centro Superior de Investigación en Salud Pública (FISABIO)- Universitat de València, Valencia, Spain*

*7 CIBER en Epidemiología y Salud Pública CIBERESP, Spain*

*8 Unidad de Medicina y Cirugía Experimental, Hospital General Universitario Gregorio Marañón*

*9 Departamento de Medicina, Facultad de Medicina, Universidad Complutense de Madrid, Madrid, Spain*

\*Corresponding author: Darío García de Viedma, PhD  
Servicio de Microbiología y Enfermedades Infecciosas  
Hospital General Universitario Gregorio Marañón  
Instituto de Investigación Sanitaria Gregorio Marañón  
C/ Dr Esquerdo, 46  
28007 Madrid, Spain  
Fax: 91 5044906  
e-mail:dgriedma2@gmail.com



## ABSTRACT

Despite the fact that clonal complexity has been progressively accepted in the infection by *Mycobacterium tuberculosis* (MTB), analysis dissecting in detail cases with these kind of infections are very limited. In this study, we selected as representative of a clonally complex infection a case with different MTB clonal variants detected in recurrent episodes 14 months apart. We studied in depth this case by integrating standard genotyping analysis, whole genome sequencing, gene expression analysis and evaluation of infectivity in *in vitro* and *in vivo* models. The variants isolated from each sequential episode differed in one MIRU-VNTR locus, one IS6110 copy and 11 SNPs. One of these differential SNPs mapped in *mce3R*, which codifies for a repressor of an operon involved in virulence, and impacted on the expression of the first gene in the operon. Competitive *in vivo* and *in vitro* co-infection assays revealed a higher infective efficiency for the clonal variant which had emerged in the second episode. A new clonal variant, which had not been observed in the clinical isolates, appeared in one of the *in vitro* infection assays, and it showed a higher fitness than its parental strain. Our study could constitute an example of the integrative efforts that are needed to advance in our knowledge of the role and meaning of microevolution in the infection by MTB.

## INTRODUCTION

The idea that *Mycobacterium tuberculosis* (MTB) infection of a single case is exclusively caused by a single strain has been increasingly debated. The application of genotypic methods has allowed us to describe cases of simultaneous co-infection by two different strains (mixed infection) or coexistence of clonal variants (polyclonal infection) [1-6]. In the later case, clonal variants emerge by microevolution phenomena which lead to the detection of subtle changes when applying the standard fingerprinting strategies (IS6110-RFLP or MIRU-VNTR). These changes can have a functional impact, and it has been described either on the expression of neighbouring genes or in increasing the variability of proteins with antigenic properties [7-12]

Most of the studies focusing on the analysis of microevolution in the infection by MTB or in the functional characterization of MTB clonal variants are limited to the description of the genotypic changes involved or, if they include some functional analysis it only partially covers either gene expression assays or standard infection models. In our study we aim to escape from this fragmented vision of clonal complexity of the infection by MTB. We selected a representative case of clonally complex infection by MTB and fully dissected it by integrating i) complete characterization of the variants, not only by standard genotyping analysis but also by whole genome sequencing, ii) gene expression analysis and iii) evaluation of infectivity, analyzing the behaviour of clonal variants not only in standard infections but also in coinfections in experimental conditions wider than usual, applying both cellular and animal models. Our study could constitute an example of the integrative efforts that are needed to advance in our knowledge of the role and meaning of microevolution in the infection by MTB.

## MATERIALS AND METHODS

### ***M. tuberculosis* clonal variants**

The clonal variants (A and B) were isolated from a patient (patient 37) with recurrent TB described in Martin et al. [13]. The two variants were isolated 14 months apart and the preliminary characterization by MIRU-VNTR analysing 15 loci detected a single locus variation in MIRU42 (3 repetitions in variant A and 1 repetition in variant B).

### **Expanded characterization of the clonal variants**

The characterization of the clonal variants was completed by performing MIRU-VNTR of 24 loci [14] as described in Navarro et al. [5] and IS6110-RFLP, following international standardization guidelines [15]. Whole genome sequencing from DNA purified from Löwenstein-Jensen slants was performed as detailed elsewhere [16]. We followed standard library preparation protocols based on the recommendations for Illumina TruSeq DNA sample preparation. A HiSeq 2000 device generating 101-51-bp paired-end reads was used for sequencing. We mapped the reads for each strain using the Burrows-Wheeler Aligner to map the MTB ancestral genome as detailed elsewhere [17]. SNP calls were made with SAMtools (coverage of at least 10×, mean SNP mapping quality of 20) and later corroborated by VarScan (coverage of at least 10×, 95% of the reads to call a homozygous position, SNP found in both strands, and SNP quality of 20). Alternatively, VarScan also enabled us to analyze the strains using a multisample SNP calling approach. Multisample analysis is also implemented in VarScan and has the potential to exploit the joint evidence contributed by each strain to enhance SNP calling. The per base depth of sequencing (715×-1252×) allowed us to examine low-frequency variants. We defined low

frequency variants as any SNP call in which the alternative allele had a frequency of 5-95%.

### **Gene expression assay**

Relative quantification assays using RT-PCR were performed to compare the expression of the gene involved in the microevolution events. The clonal variants were grown in 7H9 liquid media (Difco) supplemented with 10% ADC (Becton Dickinson) and 1% Tween 80 (Merck) for 3 weeks. Cell lysis and RNA extraction and purification were performed as previously described [10]. RNA was reversed-transcribed using the High Capacity RNA-to-cDNA Kit (Invitrogen, Life Technologies, CA, USA). This step was followed by qRT-PCR amplification (preincubation at 95 °C for 10 min and 45 cycles of 95 °C for 10 s, 60 °C for 10 s, and 72 °C for 20 s) using the LightCycler® FastStart DNA Master SYBR Green I kit (Roche). Efficiency was calculated using a standard curve for analyzed genes and quantitative values were calculated according as previously described [10]. Expression results were expressed as a ratio of the values obtained for the variant harbouring a SNP in the analyzed gene, with respect to the values from the *wild-type* variant. Three independent quantitative RT-PCR assays from 2 independent RNA extractions were performed. Controls including non-reverse-transcribed RNA were included to assure the absence of DNA in the samples. One-sample t test was used to determine whether the average expression ratio was statistically different from 1 ( $p < 0.05$ ).

### **Infection assays**

#### Preparation of inocula

Stored aliquotes from the cultured clonal variants in analysis were defrosted and inoculated in MGIT. Fourteen days later, 200 µl from the culture were inoculated in 5 ml

of Middlebrook 7H9 medium (Difco) supplemented with 10% ADC (Becton Dickinson) and 1% Tween 80 (Merck). The culture was incubated until it reached an Optical Density (OD<sub>600nm</sub>) measurement of 0.9. Cultures were passed through 30G gauges and distributed in aliquots that were kept frozen until analysis. The bacterial concentration in the inoculum was calculated by plating 100 µl of serial dilutions of one frosted aliquot on Middlebrook 7H11 agar (Difco) supplemented with 10% OADC (Becton Dickinson) and 0.5% glycerol (Merck).

#### *In vivo* infection model

Specific pathogens free (spf) female Balb/c mice, eight-week-old, were obtained from Charles River Laboratories (L'Arbresle, France) and from the animal experimental laboratory (Instituto de Investigación Sanitaria Gregorio Marañón, Madrid, Spain). They were shipped in adequate travel conditions, with the corresponding certificate of health and origin. All the animals were kept under controlled conditions, with food and water *ad libitum*, in a Biosafety Level 3 Facility.

Mice were anesthetized by intraperitoneal injection with xylazine (0.75mg/g) and ketamine (0.1mg/g) and subsequently infected with 200µl of inoculum ( $1-5 \times 10^5$  bacilli) by intravenous inoculation in lateral veins of tail.

The infections of each clonal variant were followed by monitoring colony forming units (CFUs) counts. The lungs and spleen of the infected mice were individually homogenized in PBS supplemented with 0.05% Tween 80. Serial 10-fold dilutions of the homogenate were plated on Middlebrook 7H11 agar (Difco). The growth rates for each clonal variant were calculated by lineal regression of CFUs logarithm. Eighteen mice were

infected, and 3 mice were analysed in each point for each strain (day 1, week 1 and week 3).

The assays in which the mice were simultaneously coinfecting with the two clonal variants were analyzed by comparing the proportion between the coinfecting strains before (adjusting to a 1:1 proportion) and after the infection. The lungs and spleen of the infected mice were individually homogenized and plated at each time point (day 1 and week 5), to analyze the allelic value of MIRU24 in 40 single colonies. Ten mice were coinfecting and standard deviations were calculated on the basis of the results obtained from 5 mice in each point.

#### *In vitro* infection model

THP-1 cells (TIB-202; Manassas, Virginia, USA) were grown in modified RPMI 1640 + L-glutamine (Gibco, Grand Island, NY, USA) supplemented with 10% fetal bovine serum (Gibco, Grand Island, NY, USA), 10 mM HEPES, and 50 µg/ml gentamicin (Gibco, Grand Island, NY) and incubated at 37°C in 5% CO<sub>2</sub> in a humidified incubator. Cells were differentiated to macrophages by the addition of phorbol myristate acetate (PMA, Sigma, St. Louis, MO, USA; final concentration of 100 nM).

Cells were simultaneously coinfecting with both clonal variants following the protocol described by Alonso et al. [18] with a multiplicity of infection of 3 bacteria per cell. The proportion between the coinfecting variants was calculated at 3 hours and day 7 by plating 10-fold serial dilutions of lysates on Middlebrook 7H11 agar (Difco). Seventy colonies at each point were analyzed by simplex PCR of MIRU 42 locus.

### **Fitness assay**

Clonal variants were subcultured on Mycobacteria Growth Indicator Tubes (BACTEC MGIT 960 System; Becton Dickinson) supplemented with BBL™ PANTA™ and BACTEC MGIT 960 Growth Supplement as indicated by the manufacturer. Inocula were performed from 3-day positive tubes following the same protocol than for antimicrobial susceptibility testing. Three MGITs were inoculated after assuring equivalent bacterial concentration in the three inoculum aliquotes used, by plating them in Middlebrook 7H11 agar (Difco). Growth curves were obtained by monitoring the growth units (GU) every hour using the BD EpiCenter™ software. The fitness of the clonal variants was compared by two parameters taken from the growth curves: i) lag phase [time to positive threshold (75 GU)] and ii) rate growth (time required for the 4000-6000 GU increase).

The means and standard deviations were determined and one-way analysis with repetitive measures was used to determine P values, which were adjusted using the Bonferroni method.

## RESULTS

### Complete characterization of clonal variants

The available genotypic characterization of the clonal variants by MIRU-VNTR analysis of 15 loci was expanded to 24 loci, IS6110-RFLP and whole genome sequencing. Differences in VNTR analysis were restricted to the MIRU24 locus (SLV: 3 repetitions in variant A and 1 repetition in variant B) (Fig 1a). According to RFLP, an additional band was detected in variant B (Fig 1a). WGS revealed 11 different SNPs between the two variants. After comparing the WGS data with the most recent common ancestor of MTB as a reference, we obtained 6 specific SNPs from the variant A and 5 from the variant B (Fig 1b).

Regarding the 6 specific SNPs from variant A, 3 were nonsynonymous and mapped in Rv1963c (*mce3R*), Rv2579 (*dhaA*), and Rv2921c (*ftsY*) genes. The remaining 3 synonymous SNPs mapped in Rv0836c, Rv1487 and Rv1497 (*lipL*). For the 5 SNPs from variant B, 4 were nonsynonymous and mapped in Rv1201c, Rv1527c (*pks5*), Rv1553 (*frdB*) and Rv2209 genes, and the remaining one was intergenic.

For the evaluation of the potential impact of the SNP-based variability we focused on the SNP mapping in Rv1963c (*mce3R*) because it codifies for a repressor of several genes, including the *yrbE3A*-Rv1975 operon, a well known system involved in virulence. We compared the expression of the first gene in the operon, *yrbE3A* in the two variants using the primers FyrbE3A: 5'-GGTGTTCATGCACGTCT-3' and RyrbE3A: 5'-CCGACCGACATGCCCTTATA-3'. A 0.7910-fold ratio (0.6936-0.8884;  $p < 0.05$ ) was observed in the expression of *yrbE3A* in variant A compared to variant B, indicating that the SNP detected in the variant A increased the efficiency of the repressor *mce3R*.



### **Infectivity of clonal variants**

The infectivity of the clonal variants was measured in both murine and cellular models. In the mice infection model, not significant differences were found in the growth rates of each variant neither in lung ( $0.8039 \pm 0.1707$  and  $0.8658 \pm 0.1683$  for variants A and B) nor in spleen ( $0.2328 \pm 0.2996$ ,  $0.5926 \pm 0.1911$  for variants A and B).

To evaluate the occurrence of subtle differences between the infectivity of the variants, that were not revealed in standard infection assays, we performed competitive assays, simultaneously infecting mice with the two clonal variants. We did not detect differences in the proportion of the variants at day 1 compared with the proportion in the inoculum [both in lung and spleen (Fig. 2a)]. However, the representativity of variant B between day 1 and week 5 increased both in lung (from  $0.3095 \pm 0.0336$  at day 1 to  $0.5058 \pm 0.0950$  at week 5) and spleen (from  $0.2019 \pm 0.0624$  at day 1 to  $0.3638 \pm 0.0779$  at week 5) ( $p < 0.05$ ) (Fig. 2a).

To get new evidences of the likely higher infectivity of the clonal variant B, we performed a new coinfection experiment, now in macrophages, and modifying the inoculum to force an underrepresentation of the clonal variant B (96:4). Even at this disbalanced proportion, a more efficient uptake was observed for variant B compared to variant A, meaning that the 96:4 proportion in the inoculum turned into 61:39 at 3 hours (Fig. 2b). The measurements at day 7 could not be properly done due to an unexpected finding. A new clonal variant, not detected before, was detected (variant C: 2 repetitions in MIRU 42 locus). In the new scenario, the three variants were found at a proportion 62:10:28 (A:B:C) (Fig. 2b). Thus indicating that representativity of variant A remained constant compared with 3 hours, whereas for variant B decreased.

### **Characterization of the new clonal variant**

The new emerged variant was isolated to be fully characterized. The MIRU-VNTR analysis indicated that the variant C only harboured a difference in MIRU 42 locus (allelic value 2). The IS6110-RFLP type was identical to clonal variant B (Fig. 3), suggesting that variant B was its parental strain (Fig. 3). We selected one of the Rvs (Rv1963c) where we had detected differential SNPs between variants A and B and the allele for variant B was also found by Sanger sequencing in variant C, confirming that variant B was the parental strain of variant C.

The fitness of the new emerged variant C was compared with that from the other two variants. It was higher for variant C, as indicated by its shorter lag phase [ $219 \pm 5.292$  hours vs  $260 \pm 12.12$  hours (variant B) and  $255.3 \pm 12.5$  (variant A);  $p < 0.01$ ] (Fig. 4a) and rate of growth [ $25.62 \pm 1.22$  hours vs  $71.23 \pm 16.32$  hours (variant B) and  $56.84 \pm 5.569$  hours (variant A);  $p < 0.05$ ] (Fig. 4b).

## DISCUSSION

We have in-depth studied the clonal variants which emerged sequentially in a patient with recurrent tuberculosis. A first genotypic characterization, based on MIRU-VNTR and IS6110-RFLP analysis, confirmed that the strains isolated from each episode were clonal variants because they only differed in a DLV (Double Locus Variant) in MIRU 42 locus, and in one IS6110 copy. Similar subtle differences have been described for clonal variants in different studies [1, 5, 6].

WGS was applied to obtain a more exhaustive description of the degree of variability between the clonal variants in analysis and 11 SNPs were identified between them. These figures are higher than expected according to the variability observed either in transmission chains or intrapatient, which led to establish a 5 SNPs similarity threshold to consider relatedness between independent isolates [19]. To clarify this point, we performed a new analysis using the most recent common ancestor of *Mycobacterium tuberculosis* as a reference [20, 21]. This study revealed that variant B did not evolve directly from variant A because 6 and 5 SNPs were specific of variant A and B respectively. Therefore, each variant represent an independent evolutionary path from a common parental strain that had not been sampled in the analyzed specimens. The results obtained from this new analysis fitted better with the variability consensus thresholds [19], and illustrates how a proper reference is needed to obtain the true phylogenetic relationships between clonal variants.

The WGS analysis gave us also some clues about the potential functional meaning of the two evolutionary routes followed by these clonal variants. Regarding variant A specific SNPs, the most remarkable one is a nonsynonymous substitution mapping in the essential gene *mce3R*, a transcriptional repressor of the *mce3R* regulon, involved in related lipid metabolism and redox reactions [22]. The expression of the first gene in the *mce3*

operon, *yrbE3A*, in variant A was lower than in variant B indicating that the SNP found in A leads to a higher efficiency of the repressor, which would likely have a functional effect. Another nonsynonymous SNP mapped in *ftsY* (Rv2921c), an essential gene coding a membrane-bound SRP (signal recognition particle) receptor. The remaining nonsynonymous SNP mapped in the catalytic core domain I of a haloalkane dehalogenase (*dhaA*, Rv2579) [23]. Regarding the variant B five specific SNPs, four were nonsynonymous, and mapped in genes with a potential functional impact. One mapped in the essential gene *dapD* (Rv1201c) which is part of the L-lysine biosynthetic pathway [24]. Another SNP mapped in the catalytic domain (*frdB*, Rv1553) of the fumarate reductase (FRD) complex, which is over-expressed in oxygen-limited cultures [25]. Two other SNPs mapped in *pks5* (Rv1527c), which codifies for a polyketide synthase involved in the production of lipooligosaccharides (LOS) of the cell envelope, and in an integral membrane protein (Rv2209). These SNPs could be involved in conformational changes in cell envelope which could allow it to escape from immune control.

The potential functional impact of several of the specific SNPs acquired for each clonal variant as deduced from the *in silico* analysis, together with the differential gene expression observed for *mce3R* and with their previously reported differences according to TNF $\alpha$  production when infecting macrophages [13], led us to explore in detail the infective behavior of the clonal variants. A first assay in a standard mice model did not shown differences, as had happened before when evaluating infectivity in a standard infection on PMA-differentiated THP-1 cells [13]. Previous results from our group indicated that the subtle differences in infectivity expected between clonal variants emerging by microevolution, required non-standard infection models to be revealed [26]. Based on that, a competitive infection in mice with simultaneous coinfection by both variants and in these new conditions, the infection dynamics of clonal variant B were more successful compared

with variant A. To corroborate the higher infectivity phenotype of variant B we run a second competitive co-infection assay, now in macrophages, with a severely imbalanced representation of variant B, supported in previous studies in which strains with a higher infectivity also show their advantageous phenotype in co-infection assays regardless its representation in the inoculum [27]. The advantageous phenotype of variant B was confirmed in these challenging conditions and surprisingly, and likely due to this severe imbalance, a new variant emerged, which had not been identified in the clinical specimens. This finding suggested some high tendency to microevolve of this strain.

The new evolutionary scenario offered by this unexpected event led to the comparative analysis of the new variant C together with the two previous ones. A higher fitness was detected for variant C and a new analysis of the potential role of its genetic peculiarities on that phenotype was performed. The variation in the MIRU 42 locus is not expected to have an impact since this locus has an intergenic location. The absence of differential SNPs cannot explain the greater fitness.

Summarizing, we present an in-depth study of clonal variants detected in sequential episodes of a recurrent TB case. WGS analysis suggested that instead of a sequential microevolution we faced two variants which microevolved from a non-sampled common parental strain, suggesting that they represent two independent exploratory branches in a microevolution event. In addition to the potential impact of the subtle genetic variations found between the variants, differential gene expression and differential infectivity were observed. Non-standard infection models had to be used to reveal the differential infective behaviours of the variants. A new microevolution event was unexpectedly recorded during one of the experimental assays, which led to the emergence of a new clonal variant with a

higher fitness which has not been previously detected in the clinical specimens, which suggested a high tendency to microevolve of this strain.

Additional efforts to perform complete analysis integrating molecular and genomic analysis together with infection models must be done to advance in our knowledge of the dynamics, role and meaning of microevolution in the infection by MTB.

### **Acknowledgements**

This work was supported by Fondo de Investigaciones Sanitarias (FIS; ISCIII, Plan Nacional I+D+I 2013-2016) (Ref 13/01207, 12/02080) and cofinanced by FEDER funds. Research by Yurena Navarro was supported by a PICATA predoctoral fellowship (BE55/11) from the Moncloa Campus of International Excellence (UCM-UPM, Instituto de Investigación Sanitaria Gregorio Marañón). We thank Laura Delgado from Centro de Vigilancia Sanitaria Veterinaria for helping in animal and technical support.

**Figure 1**

A)

Clonal variant	Year of isolation	MIRU-VNTRtype	IS6110-RFLPtype
A	2000	225132261423 <b>34</b> 2132235423	
B	2001	225132261423 <b>14</b> 2132235423	*

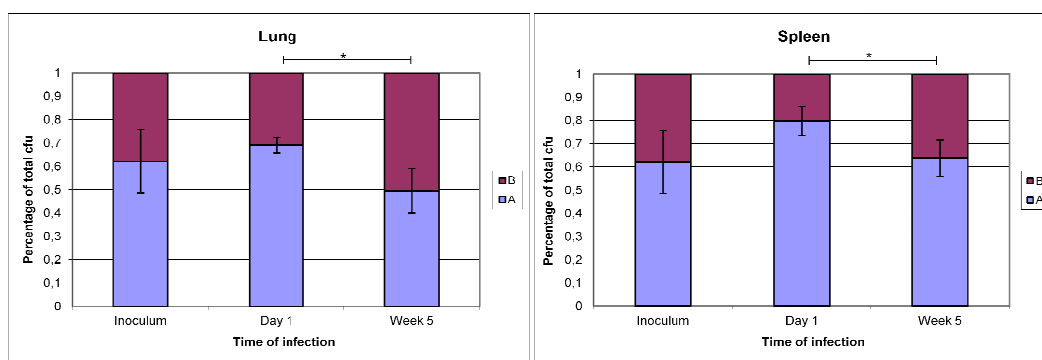
B)

Variant A	Ancestor	S/NS/I	Gene
T	C	NS	Rv1963c ( <i>mce3R</i> )
C	A	NS	Rv2579 ( <i>dhaA</i> )
T	C	NS	Rv2921c ( <i>ftsY</i> )
T	C	S	Rv0836c
G	T	S	Rv1487
G	C	S	Rv1497 ( <i>lipL</i> )
Variant B	Ancestor	S/NS/I	Gene
T	C	NS	Rv1201c
T	G	NS	Rv1527c ( <i>pks5</i> )
A	G	NS	Rv1553 ( <i>frdB</i> )
G	C	NS	Rv2209
C	G	I	Rv2644c-Rv2645

Figure 1. Genotypic features of the clonal variants A and B. A) Genotypes of variants. MIRU-VNTR locus differing between the variants is highlighted in bold. Asterisk indicates the additional IS6110 band in variant B. B) Specific SNPs from variants obtained by WGS. S=synonymous SNP; NS= Non-synonymous SNP; I=Intergenic SNP

**Figure 2**

A)



B)

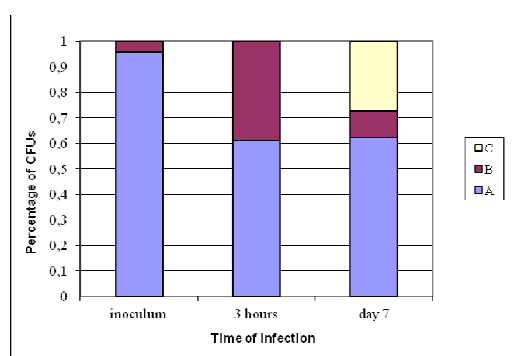


Figure 2. Coinfection assays with both clonal variants. Asterisks indicate statistical significance ( $p < 0.05$ ). A) Proportion between the coinfecting variants obtained in lung (left panel) and spleen (right panel) from 5 mice at each point. B) Coinfection of THP-1 cells with the clonal variants.



**Figure 3**

Clonal variant	Year of isolation	MIRU-VNTRtype	IS6110-RFLPtype
C	2014	225132261423 <b>242132235423</b>	*

Figure 3. Genotypes of variant C. MIRU-VNTR locus differing between the variants A and B is highlighted in bold. Asterisk indicates the same additional IS6110 band obtained from variant B.

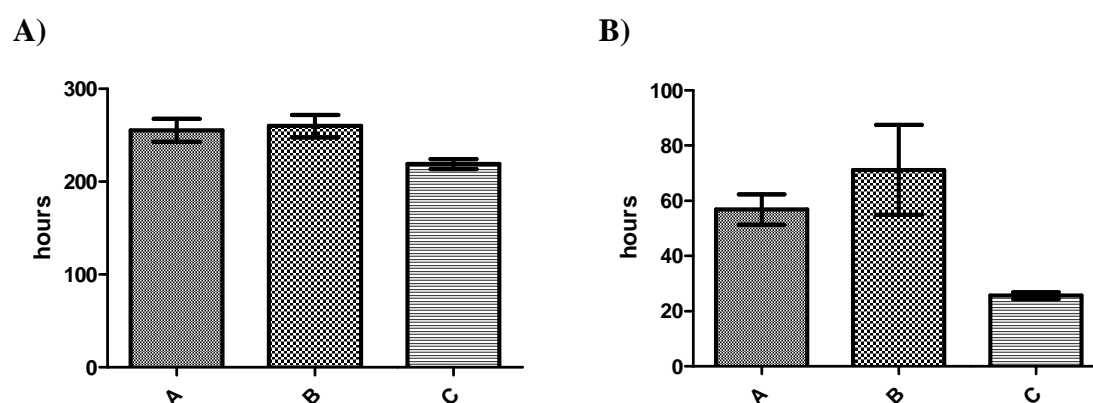
**Figure 4**

Figure 4. Fitness assay of the three variants. A) Lag phase [time to positive threshold (75 GU)]. Asterisks indicate statistical significance ( $p < 0.01$ ). B) Rate growth (time required for the 4000-6000 GU increase). Asterisk indicates statistical significance ( $p < 0.05$ ).

## References

1. Al-Hajoj SA, Akkerman O, Parwati I, al-Gamdi S, Rahim Z, van Soolingen D, van Ingen J, Supply P, van der Zanden AG: Microevolution of *Mycobacterium tuberculosis* in a tuberculosis patient. *J Clin Microbiol* 2010, 48(10):3813-3816.
2. Garcia de Viedma D, Alonso Rodriguez N, Andres S, Ruiz Serrano MJ, Bouza E: Characterization of clonal complexity in tuberculosis by mycobacterial interspersed repetitive unit-variable-number tandem repeat typing. *J Clin Microbiol* 2005, 43(11):5660-5664.
3. Huyen MN, Kremer K, Lan NT, Cobelens FG, Buu TN, Dung NH, Caws M, Tiemersma EW, van Soolingen D: Mixed tuberculosis infections in rural South Vietnam. *J Clin Microbiol* 2012, 50(5):1586-1592.
4. Muwonge A, Kankya C, Olea-Popelka F, Biffa D, Ssengooba W, Berit D, Skjerve E, Johansen TB: Molecular investigation of multiple strain infections in patients with tuberculosis in Mubende district, Uganda. *Infect Genet Evol* 2013, 17:16-22.
5. Navarro Y, Herranz M, Perez-Lago L, Martinez Lirola M, Ruiz-Serrano MJ, Bouza E, Garcia de Viedma D: Systematic survey of clonal complexity in tuberculosis at a populational level and detailed characterization of the isolates involved. *J Clin Microbiol* 2011, 49(12):4131-4137.
6. Shamputa IC, Jugheli L, Sadradze N, Willery E, Portaels F, Supply P, Rigouts L: Mixed infection and clonal representativeness of a single sputum sample in tuberculosis patients from a penitentiary hospital in Georgia. *Respir Res* 2006, 7:99.
7. Akhtar P, Singh S, Bifani P, Kaur S, Srivastava BS, Srivastava R: Variable-number tandem repeat 3690 polymorphism in Indian clinical isolates of *Mycobacterium tuberculosis* and its influence on transcription. *J Med Microbiol* 2009, 58(Pt 6):798-805.
8. Olsen I, Balasingham SV, Davidsen T, Debebe E, Rodland EA, van Soolingen D, Kremer K, Alseth I, Tonjum T: Characterization of the major formamidopyrimidine-DNA glycosylase homolog in *Mycobacterium tuberculosis* and its linkage to variable tandem repeats. *FEMS Immunol Med Microbiol* 2009, 56(2):151-161.
9. Perez-Lago L, Herranz M, Lirola MM, Bouza E, Garcia de Viedma D: Characterization of microevolution events in *Mycobacterium tuberculosis* strains involved in recent transmission clusters. *J Clin Microbiol* 2011, 49(11):3771-3776.
10. Perez-Lago L, Navarro Y, Herranz M, Bouza E, Garcia-de-Viedma D: Differences in gene expression between clonal variants of *Mycobacterium tuberculosis* emerging as a result of microevolution. *Int J Med Microbiol* 2013, 303(8):674-677.
11. Tantivitayakul P, Panapruksachat S, Billamas P, Palittapongarnpim P: Variable number of tandem repeat sequences act as regulatory elements in *Mycobacterium tuberculosis*. *Tuberculosis (Edinb)* 2010, 90(5):311-318.
12. Yindeeyoungyeon W, Likitvivatanavong S, Palittapongarnpim P: Characterization of alpha-isopropylmalate synthases containing different copy numbers of tandem repeats in *Mycobacterium tuberculosis*. *BMC Microbiol* 2009, 9:122.
13. Martin A, Herranz M, Navarro Y, Lasarte S, Ruiz Serrano MJ, Bouza E, Garcia de Viedma D: Evaluation of the inaccurate assignment of mixed infections by *Mycobacterium tuberculosis* as exogenous reinfection and analysis of the potential role of bacterial factors in reinfection. *J Clin Microbiol* 2011, 49(4):1331-1338.

14. Oelemann MC, Diel R, Vatin V, Haas W, Rusch-Gerdes S, Locht C, Niemann S, Supply P: Assessment of an optimized mycobacterial interspersed repetitive- unit-variable-number tandem-repeat typing system combined with spoligotyping for population-based molecular epidemiology studies of tuberculosis. *J Clin Microbiol* 2007, 45(3):691-697.
15. van Embden JD, Cave MD, Crawford JT, Dale JW, Eisenach KD, Gicquel B, Hermans P, Martin C, McAdam R, Shinnick TM *et al*: Strain identification of *Mycobacterium tuberculosis* by DNA fingerprinting: recommendations for a standardized methodology. *J Clin Microbiol* 1993, 31(2):406-409.
16. Perez-Lago L, Comas I, Navarro Y, Gonzalez-Candelas F, Herranz M, Bouza E, Garcia-de-Viedma D: Whole genome sequencing analysis of inpatient microevolution in *Mycobacterium tuberculosis*: potential impact on the inference of tuberculosis transmission. *J Infect Dis* 2014, 209(1):98-108.
17. Gardy JL, Johnston JC, Ho Sui SJ, Cook VJ, Shah L, Brodtkin E, Rempel S, Moore R, Zhao Y, Holt R *et al*: Whole-genome sequencing and social-network analysis of a tuberculosis outbreak. *N Engl J Med* 2011, 364(8):730-739.
18. Alonso M, Alonso Rodriguez N, Garzelli C, Martinez Lirola M, Herranz M, Samper S, Ruiz Serrano MJ, Bouza E, Garcia de Viedma D: Characterization of *Mycobacterium tuberculosis* Beijing isolates from the Mediterranean area. *BMC Microbiol* 2010, 10:151.
19. Walker TM, Ip CL, Harrell RH, Evans JT, Kapatai G, Dedicoat MJ, Eyre DW, Wilson DJ, Hawkey PM, Crook DW *et al*: Whole-genome sequencing to delineate *Mycobacterium tuberculosis* outbreaks: a retrospective observational study. *Lancet Infect Dis* 2013, 13(2):137-146.
20. Comas I, Chakravarti J, Small PM, Galagan J, Niemann S, Kremer K, Ernst JD, Gagneux S: Human T cell epitopes of *Mycobacterium tuberculosis* are evolutionarily hyperconserved. *Nat Genet* 2010, 42(6):498-503.
21. Comas I, Coscolla M, Luo T, Borrell S, Holt KE, Kato-Maeda M, Parkhill J, Malla B, Berg S, Thwaites G *et al*: Out-of-Africa migration and Neolithic coexpansion of *Mycobacterium tuberculosis* with modern humans. *Nat Genet* 2013, 45(10):1176-1182.
22. de la Paz Santangelo M, Klepp L, Nunez-Garcia J, Blanco FC, Soria M, Garcia-Pelayo MC, Bianco MV, Cataldi AA, Golby P, Jackson M *et al*: Mce3R, a TetR-type transcriptional repressor, controls the expression of a regulon involved in lipid metabolism in *Mycobacterium tuberculosis*. *Microbiology* 2009, 155(Pt 7):2245-2255.
23. Mazumdar PA, Hulecki JC, Cherney MM, Garen CR, James MN: X-ray crystal structure of *Mycobacterium tuberculosis* haloalkane dehalogenase Rv2579. *Biochim Biophys Acta* 2008, 1784(2):351-362.
24. Schuldt L, Weyand S, Kefala G, Weiss MS: The three-dimensional Structure of a mycobacterial DapD provides insights into DapD diversity and reveals unexpected particulars about the enzymatic mechanism. *J Mol Biol* 2009, 389(5):863-879.
25. Li AH, Lam WL, Stokes RW: Characterization of genes differentially expressed within macrophages by virulent and attenuated *Mycobacterium tuberculosis* identifies candidate genes involved in intracellular growth. *Microbiology* 2008, 154(Pt 8):2291-2303.
26. Navarro Y, Perez-Lago L, Sisilema F, Herranz M, de Juan L, Bouza E, Garcia-de-Viedma D: Unmasking subtle differences in the infectivity of microevolved *Mycobacterium tuberculosis* variants coinfecting the same patient. *Int J Med Microbiol* 2013, 303(8):693-696.

27. Barczak AK, Domenech P, Boshoff HI, Reed MB, Manca C, Kaplan G, Barry CE, 3rd: In vivo phenotypic dominance in mouse mixed infections with *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolates. *J Infect Dis* 2005, 192(4):600-606.

# Persistent Infection by a *Mycobacterium tuberculosis* Strain That Was Theorized To Have Advantageous Properties, as It Was Responsible for a Massive Outbreak

Laura Pérez-Lago,<sup>a,b,c</sup> Yurena Navarro,<sup>a,b,c,d</sup> Pedro Montilla,<sup>a,b</sup> Iñaki Comas,<sup>e,f</sup> Marta Herranz,<sup>a,b,c</sup> Carlos Rodríguez-Gallego,<sup>g,i</sup> María Jesús Ruiz Serrano,<sup>a,b,c</sup> Emilio Bouza,<sup>a,b,c,h</sup> Darío García de Viedma<sup>a,b,c,d</sup>

Servicio Microbiología Clínica y Enfermedades Infecciosas, Hospital General Universitario Gregorio Marañón, Madrid, Spain<sup>a</sup>; Instituto de Investigación Sanitaria Gregorio Marañón, Madrid, Spain<sup>b</sup>; CIBER Enfermedades Respiratorias, Spain<sup>c</sup>; CEI Campus Moncloa, UCM-UPM, Madrid, Spain<sup>d</sup>; Genomics and Health Unit, FISABIO Public Health, Valencia, Spain<sup>e</sup>; CIBER Salud Pública, Spain<sup>f</sup>; Department of Immunology, Hospital Universitario Son Espases, Palma de Mallorca, Spain<sup>g</sup>; Departamento de Medicina, Facultad de Medicina, Universidad Complutense de Madrid, Madrid, Spain<sup>h</sup>; Research Institute of Health Sciences, Palma de Mallorca, Spain<sup>i</sup>

The strains involved in tuberculosis outbreaks are considered highly virulent and transmissible. We analyzed the case of a patient in Madrid, Spain, who was persistently infected over an 8-year period by the same Beijing *Mycobacterium tuberculosis* strain. The strain was responsible for a severe outbreak on Gran Canaria Island. The case provides us with a unique opportunity to challenge our assumptions about *M. tuberculosis* Beijing strains. No clinical/radiological findings consistent with a virulent strain were documented, and the *in vitro* growth rate of the strain in macrophages was only moderate. No secondary cases stemming from this prolonged active case were detected in the host population. The strain did not acquire resistance mutations, despite constant treatment interruptions, and it remained extremely stable, as demonstrated by the lack of single-nucleotide polymorphism (SNP)-based differences between the sequential isolates. Our data suggest that the general assumption about *M. tuberculosis* Beijing strains having advantageous properties (in terms of virulence, transmissibility, and the tendency to acquire mutations and resistance) is not always accurate.

Genotyping makes it possible to discriminate between different lineages of *Mycobacterium tuberculosis* and enables us to identify highly virulent strains with advantageous properties. The Beijing lineage (1–3) has generated the most attention for a number of reasons. First, it is highly transmissible and responsible for severe outbreaks (2). Second, studies based on cellular and animal models reveal higher virulence for most Beijing strains (4–6). Third, Beijing strains are thought to have a hypermutator phenotype (7), which could increase the tendency to acquire variability and, more specifically, resistance mutations (8).

In this study, we present a clinical case with persistent active infection by a Beijing *M. tuberculosis* strain over an 8-year period. This case provides us with a unique opportunity to analyze the behavior of a strain with advantageous properties. We examined virulence, transmissibility, variability, and acquisition of resistance. The added value of this case is that the Beijing strain involved is considered very highly transmissible: it caused a severe outbreak on Gran Canaria Island, where it spread after its introduction by a Liberian immigrant in 1993 (2), eventually accounting for one-third of all cases of tuberculosis on the island.

## MATERIALS AND METHODS

**Immunological studies.** This research was approved by the research review board at our institution. The production of interleukin 12 p70 (IL-12p70) and tumor necrosis factor alpha (TNF- $\alpha$ ) in response to recombinant human gamma interferon (rhIFN- $\gamma$ ) was assessed in whole blood cultures diluted 1:2 in RPMI 1640 (Lonza). Cultures were left unstimulated or were stimulated with 100 ng/ml lipopolysaccharide (LPS) from *Salmonella enterica* serovar Enteritidis (Sigma), either alone or in combination with various concentrations ( $10^2$  to  $10^5$  IU/ml) of rhIFN- $\gamma$  (R&D Systems). Supernatants were collected after 24 h of incubation at 37°C in a 5% CO<sub>2</sub> atmosphere (9). The production of IFN- $\gamma$  was analyzed in whole-blood cultures diluted 1:1 in RPMI 1640. Cultures were left un-

stimulated or were stimulated for 48 h with phytohemagglutinin (PHA; 5  $\mu$ g/ml; Roche) or live *Mycobacterium bovis* bacille Calmette-Guérin (BCG; 5 mg/ml; Sanofi Pasteur Limited), either alone or in combination with rhIL-12p70 (20 ng/ml; R&D Systems) (10). The response to TNF- $\alpha$  was analyzed by evaluating the production of IL-10 and IL-8 in whole-blood cultures diluted 1:1 in RPMI 1640. Cultures were left unstimulated or were stimulated for 48 h with 20 ng/ml of TNF- $\alpha$ .

Peripheral blood mononuclear cells (100,000/well) were resuspended in RPMI 1640 supplemented with 10% FCS (Biocrom). Cells were stimulated with 12.5 ng/ml soluble anti-CD3 (12.5 ng/ml; clone HIT3a; Becton Dickinson) or PHA-L (10  $\mu$ g/ml; Roche), both alone and in combination with IL-12 (20 ng/ml; R&D Systems), soluble anti-CD3 plus soluble anti-CD28 (250 ng/ml; Sanquin), staphylococcal enterotoxin B from *Staphylococcus aureus* (SEB; 1  $\mu$ g/ml; Sigma Chemical Co.), or 10 ng/ml of phorbol myristate acetate (PMA; Sigma Chemical Co.) plus 1  $\mu$ g/ml of ionomycin (Sigma Chemical Co.). Cells were cultured in U-bottom, 96-well plates (0.2 ml/well) for 48 h.

The levels of TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-8, IL-10, IL-12p70, IFN- $\gamma$ , IL-2, and IL-17 in cultures were measured using a flow cytometry-based bead array system (BD Biosciences).

Received 27 May 2015 Returned for modification 25 June 2015  
Accepted 1 August 2015

Accepted manuscript posted online 12 August 2015

Citation Pérez-Lago L, Navarro Y, Montilla P, Comas I, Herranz M, Rodríguez-Gallego C, Ruiz Serrano MJ, Bouza E, García de Viedma D. 2015. Persistent infection by a *Mycobacterium tuberculosis* strain that was theorized to have advantageous properties, as it was responsible for a massive outbreak. J Clin Microbiol 53:000–000. doi:10.1128/JCM.01405-15.

Editor: G. A. Land

Address correspondence to Darío García de Viedma, dgriedma2@gmail.com.

Copyright © 2015, American Society for Microbiology. All Rights Reserved.



TABLE 1 Summary of the MTB isolates from the case

Isolate	Date	Specimen	Typing by <sup>a</sup> :				Susceptibility to <sup>b</sup> :				
			RFLP	MIRU-24	Spoligotype	WGS	RIF	INH	PZA	SM	PZA
1	Sep 2006	Sputum	X	X	X	X					
2	Sep 2006	Sputum					S	S	S	S	S
3	Sep 2006	Sputum	X	X							
4	Jul 2007	Sputum		X		X					
5	Jul 2007	Sputum		X			S	S	S	S	S
6	Jul 2007	Sputum	X	X	X						
7	Aug 2007	Sputum		X			S	S	S	S	S
8	Aug 2008	Sputum		X							
9	Aug 2008	Pleural fluid	X	X							
10	Aug 2008	Pleural fluid									
11	Aug 2008	Pleural fluid									
12	Aug 2008	Pleural fluid									
13	Aug 2008	Urine		X							
14	Aug 2008	Sputum		X		X					
15	Sep 2008	Sputum									
16	Sep 2008	Urine					S				
17	Sep 2008	Urine									
18	Sep 2012	Sputum		X		X					
19	Sep 2012	Sputum									
20	Sep 2012	Sputum	X				S	S	S		
21	Nov 2012	Sputum									
22	Nov 2012	Sputum									
23	Apr 2013	Sputum					S	S	S		

<sup>a</sup> WGS, whole-genome sequencing; X, typing for the indicated isolate was performed.<sup>b</sup> SM, streptomycin; EMB, ethambutol; INH, isoniazid; PZA, pyrazinamide; RIF, rifampin; S, susceptible.

**Microbiological methods.** Clinical specimens were processed according to standard methods and inoculated on Lowenstein-Jensen slants and also in MGIT liquid medium (Becton Dickinson, Sparks, MD, USA). Testing for susceptibility to isoniazid, rifampin, streptomycin, and ethambutol was performed using MGIT SIRE (Becton Dickinson, Sparks, MD, USA). The *M. tuberculosis* cultures were stored at  $-70^{\circ}\text{C}$  until analysis.

**Genotyping methods.** The fingerprinting methods applied were IS6110-based restriction fragment length polymorphism (RFLP) typing, which was performed as described in reference 11, mycobacterial interspersed repetitive-unit-variable-number tandem-repeat (MIRU-VNTR) typing with the 24-locus set (12, 13), and spoligotyping, which was performed following standard procedures (14) using a commercially available kit (Isogen Bioscience BV, Maarssen, The Netherlands). We looked for identical patterns by comparing patterns from the case isolates and those in the population database. We also performed a second-line analysis in which subtle differences were allowed (1-band differences between the RFLP types or single locus variations [SLVs] between the MIRU-VNTR patterns).

High-resolution melting (HRM) analysis was performed as described elsewhere (15) to identify SNPs that are markers of Beijing strains.

**Whole-genome sequencing.** Four sequential isolates were used to identify SNPs as detailed elsewhere (16). We extracted the DNA from pooled colonies. We followed standard library preparation protocols based on the recommendations for Illumina TruSeq DNA sample preparation. A HiSeq 2000 device generating 101 51-bp paired-end reads was used for sequencing. We mapped the reads for each strain using the Burrows-Wheeler Aligner to map the *M. tuberculosis* ancestral genome, as detailed in reference 16. SNP calls were made with SAMtools (coverage of at least  $10\times$ ; mean SNP mapping quality of 20) and later corroborated by VarScan (coverage of at least  $10\times$ , 95% of the reads to call a homozygous position, SNP found in both strands, and SNP quality of 20). Alternatively, VarScan also enabled us to analyze the strains using a multisample SNP calling approach. Multisample analysis is also implemented in

VarScan and has the potential to exploit the joint evidence contributed by each strain to enhance SNP calling. The per-base depth of sequencing ( $715\times$  to  $1,252\times$ ) allowed us to examine low-frequency variants. We defined a low-frequency variant as any SNP call in which the alternative allele had a frequency of 10% to 90%. The threshold is based on a trade-off between detecting real variants and avoiding false-positive reporting.

**In vitro infection.** PMA-differentiated THP-1 cells were infected as described elsewhere (4, 17). Briefly, PMA-differentiated THP-1 cells were infected at a multiplicity of infection of 7 to 9 bacteria per cell and incubated for 3 h at  $37^{\circ}\text{C}$  in 5%  $\text{CO}_2$ . To evaluate bacterial growth, supernatants were aspirated and monolayers were lysed at 3 h and days 1, 4, and 7 after infection. Serial 10-fold dilutions of cellular lysates were plated on Middlebrook 7H11 plates and incubated for 3 weeks at  $37^{\circ}\text{C}$  in 5%  $\text{CO}_2$ , and colonies were counted. Intracellular growth was expressed as the growth rate, which is the slope of the function of  $\log_{10}$  CFU values throughout the infection period (at 3 h and at days 1, 4, and 7). Three independent experiments were performed for each strain assayed.

## RESULTS

The patient was a 45-year-old man who had been HIV positive since 1990 and was an intravenous-drug user (IVDU). He had not been vaccinated against BCG. He had spent 8 years in various prisons in the 1990s, after which time he was placed in an open prison regime. He registered with our institution and was diagnosed with *Mycobacterium tuberculosis* infection in September 2006. At the time, his CD4 count was below  $100/\mu\text{L}$ , and his opportunistic infections were oropharyngeal candidiasis and mucocutaneous infection by herpes simplex virus. *M. tuberculosis* was subsequently cultured over 8 years (2006 to 2013) from 23 clinical specimens (Table 1). The Mantoux and Quantiferon tests were

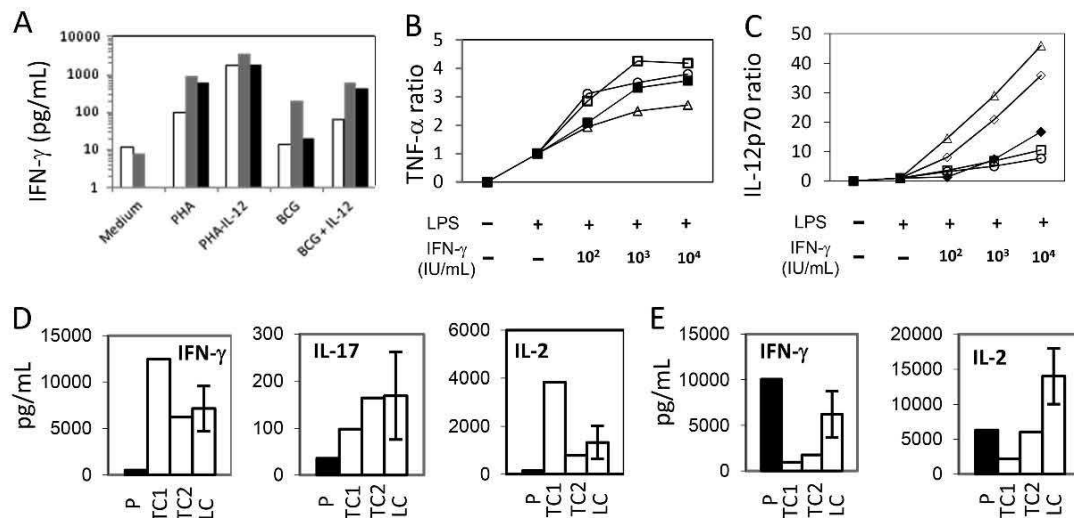


FIG 1 Analysis of the IL-12/IFN- $\gamma$  axis and of cytokine production by T cells. (A) Normal response to IL-12, measured as IFN- $\gamma$  production. Data represent the production of IFN- $\gamma$  in response to BCG or PHA alone and in response to BCG or PHA plus IL-12p70 in whole blood cultures from the patient (white bars) compared with those from 2 travel healthy controls (gray and black bars). (B and C) Normal response to IFN- $\gamma$  and to IL-12p70 production measured as the ratio of TNF- $\alpha$  (B) and IL-12p70 (C) produced in response to LPS plus increasing concentrations of IFN- $\gamma$  to that produced in response to LPS alone in whole blood cultures from the patient (solid symbols) and travel controls (open symbols). (D) Production of IFN- $\gamma$ , IL-17, and IL-2 by peripheral blood mononuclear cells from the patient activated with staphylococcal enterotoxin B from *S. aureus* compared with that produced by PBMC from 2 travel healthy controls (TC) and 5 laboratory controls (LC) (values are means  $\pm$  standard deviations [SD]). (E) Production of IFN- $\gamma$  and IL-2 by peripheral blood mononuclear cells (PBMC) from the patient activated with PMA plus ionomycin compared with that produced by PBMC from two travel healthy controls (TC) and five laboratory controls (LC) (values are mean  $\pm$  SD).

not performed because of their lack of clinical usefulness in this context.

Given the repeated isolation of *M. tuberculosis* over such a long period, we first investigated the involvement of host factors other than HIV-induced immunosuppression, namely, primary immunodeficiency, which predisposes to Mendelian susceptibility to mycobacterial disease (OMIM 209950 [<http://www.omim.org/entry/209950>]), which can first appear during adulthood. We found a normal response to IL-12, which was measured as 2 ratios: the ratio of IFN- $\gamma$  production in response to BCG plus IL-12p70 to IFN- $\gamma$  production in response to BCG alone and the ratio of IFN- $\gamma$  production in response to PHA plus IL-12p70 to IFN- $\gamma$  production in response to PHA alone (Fig. 1). We also found that the levels of IL-12R $\beta$ 1 expressed by T cells activated with PHA plus IL-2 in cultures of cells from the patient were similar to those in cultures from healthy controls (data not shown). The patient's cells also produced normal amounts of IL-12p70 and responded to IFN- $\gamma$ . The ratios of IL-12p70 and TNF- $\alpha$  production in response to LPS, whether in the presence or absence of increasing concentrations of IFN- $\gamma$ , were equivalent for the patient and for healthy controls (Fig. 1). Finally, production of IL-10 in response to TNF- $\alpha$  and production of IL-6 after activation with BCG were equivalent in both the patient and the healthy controls (data not shown).

Once the role of primary immunodeficiency had been ruled out, we evaluated the patient's treatment history. During an in-depth interview, he admitted that he had taken treatment for only 1 to 2 months after every indication, enough until his symptoms improved. He repeatedly stopped taking his medication in order to remain ill, avoid prison, and gain access to social benefits. This new scenario was more consistent with a persistent untreated in-

fection, which was confirmed by identical IS6110 RFLP and MIRU-VNTR patterns (Fig. 2a and b) for the isolates throughout the 8-year infection.

We extended the genotypic analysis to spoligotyping in order to assign the lineage to the *M. tuberculosis* strain involved in the persistent infection. The pattern revealed was characteristic of *M. tuberculosis* strains belonging to the Beijing lineage, that is, lack of spacers 1 to 34 (Fig. 2c). The Beijing lineage was confirmed using high-resolution melting analysis (Fig. 2d) and DNA sequencing to detect SNPs (in Rv2629 and Rv2952), which are markers for this family. Comparative analysis with MIRU-VNTR revealed that the Beijing strain persistently infecting our patient corresponded to the Beijing strain that was responsible for a severe outbreak on Gran Canaria Island (2). The patient was interviewed to establish epidemiological support for this finding and reported that he had spent a week on the island in the 1990s, which was before he was diagnosed with tuberculosis in our institution.

Given the fast and efficient transmission of this strain on Gran Canaria Island, the infectiveness of our patient (stain-positive in 2007 to 2012) and his transmission-associated epidemiological characteristics (IVDU, socioeconomic disadvantages, and prison stays), we looked for secondary cases infected by the same strain. Only 3 patients, all of whom had been on Gran Canaria Island before their stay in Madrid, were found to be infected by the same strain. In 2 of these patients, the diagnosis was made before that of the present case.

Despite the treatment interruptions and lack of adherence, all the susceptibility tests performed revealed exclusively pansusceptible isolates. Whole-genome sequencing of 4 available isolates from the 5 isolates that were representative of the patient's history and covered a 7-year period (2006, 2007, 2008, and 2012)



(Table 1) revealed that there were no SNPs between any 2 isolates over this prolonged period of active infection. To corroborate this finding, we compared 2 SNP calling approaches. The analysis revealed two possible SNPs acquired by the strains. However, a detailed inspection of the alignment revealed that they are involved in insertion/deletion regions and therefore they are likely false-positive SNPs.

Thanks to the high coverage achieved in the analysis ( $715\times$  to  $1,252\times$ ), we analyzed the possible presence of minority variants in greater detail. First, we analyzed variation in known drug resistance genes. No heterozygous sites were detected, suggesting that antibiotic pressure did not play a major role in the evolution of bacteria during treatment. In addition, we detected six positions with evidence of coexisting alleles. However, for three of them (2127067, 2295685, and 3119513), none of the sites had a frequency of the alternative allele below 90%, suggesting that they are true homozygous positions that are not at 100% because of background noise introduced by sequencing or mapping errors. Another site (4124351) has a frequency of the alternative allele of 60% in two strains, while for the other two, there is a deletion. Manual inspection of the alignments revealed that the same deletion has likely created a misalignment around the region for the two strains exhibiting the heterozygous SNPs. Only 2 heterozygous positions with a minimum frequency difference between isolates of 20% (1986639 and 2128040) remained after all the filters. However, evidence of heterogeneity in both cases, although strong, has to be taken with caution, as the coverage of the site in both cases is far below the mean coverage for the strain. Again, this finding suggests that intrapatient microevolution did not play a major role in this patient.

We expected higher-than-average severity of *M. tuberculosis* infection owing to the present patient's impaired T-cell function, which was probably secondary to HIV infection. Production of IL-2, IL-17, and IFN- $\gamma$  in response to T-cell-receptor-mediated activation with SEB was considerably lower in cultures of the patient's peripheral blood mononuclear cells than in those from healthy controls (Fig. 1D). In contrast, the response to PMA plus ionomycin, measured in terms of IFN- $\gamma$  and IL-2 production, was not reduced; in fact, high production of IFN- $\gamma$  was observed (Fig. 1E). Despite such a permissive environment, signs of severity such as miliary or marked cavitary disease were absent. From 2008 onward, sputum specimens were complemented by systematic blood and urine culture. However, the results were always negative except for a short period (August to September 2008) when urine was positive for *M. tuberculosis*, i.e., exactly when the CD4 counts were lowest (80/ $\mu$ l) and the HIV load was highest ( $>1,000,000$  copies/ml).

The absence of clinical findings consistent with a virulent phenotype for this strain was in line with the infective behavior of the isolate when its growth rate was evaluated in a macrophage infection model. Compared with the virulent Beijing control isolates, the growth rate for this strain was average, and it was lower than that for the reference *M. tuberculosis* strain H37Rv (Fig. 3).

## DISCUSSION

The case we present, that of continuous isolation of *M. tuberculosis* over an 8-year period, is exceptional. Primary immunodeficiency predisposing to mycobacterial disease was ruled out,

and DNA fingerprinting combined with a detailed interview provided key information. All the sequential isolates corresponded to the same strain and were the result of conscious nonadherence, which enabled the patient to avoid incarceration and obtain social benefits.

The infection involved the Beijing strain responsible for one of the most extensive outbreaks of tuberculosis ever recorded (2, 3). It provided us with an extraordinary opportunity to review the validity of some of the assumptions generally accepted for this advantage-bearing *M. tuberculosis* lineage in terms of virulence, transmissibility, and ability to acquire variability.

Beijing strains are considered virulent (18). However, this strain showed an average ability to replicate in macrophages *in vitro* (4, 17). In addition, despite marked immunosuppression of the host and prolonged persistence and treatment interruptions, no radiological findings consistent with severity were found. Systematic culture of blood and urine specimens was performed, and all blood specimens were negative, whereas urine was positive only in the short period where CD4 counts were lowest.

Given the high number of secondary cases caused by the same strain on Gran Canaria Island, one would also expect a high number of secondary cases in Madrid, especially considering that the index patient was smear positive, had spent periods of time in prison, and was an IVDU. However, against all expectations, only 3 additional cases (2 of which had been diagnosed before the present case) were caused by this strain. This value is far from the 28% of the total number of cases of tuberculosis on Gran Canaria Island. In addition, since the 3 patients had previously been on Gran Canaria Island, they were more likely infected there.

Additional cases in Madrid that were caused by the same strain may have gone undetected owing to insufficient fingerprinting coverage. The database used in the survey included the genotypes of the *M. tuberculosis* isolates from 2,669 cases. These were obtained from a multicenter molecular epidemiology study performed over 9 years in Madrid (2001 to 2009) and involving 8 hospitals (19–21). The sample corresponded to 79% and 32% of all culture-positive cases in immigrants and autochthonous patients, respectively. While it is true that only the analysis of the whole population can ensure the complete lack of additional cases infected by the strain under study, the population covered in our sample is reasonably representative. In addition, our findings for cases infected by the Madrid strain are far from the 28% obtained on Gran Canaria Island, thus showing that transmission is clearly different in each of these 2 settings. Apart from the secondary cases that might be expected from our persistent case, 2 of the other patients in Madrid infected by the same strain had pulmonary tuberculosis (the remaining one was articular) and were diagnosed before the present case (in 2002 and 2005). These cases could also have generated secondary cases owing to the patients' characteristics and history (prison stays, IVDU, alcoholism, and homelessness), but secondary cases were not detected during the 8-year molecular epidemiology survey. These data suggest that the successful transmission of this strain on Gran Canaria Island is more probably a consequence of epidemiological factors and/or social networks than of bacterial factors. The index case on Gran Canaria Island was that of a nonadherent patient with



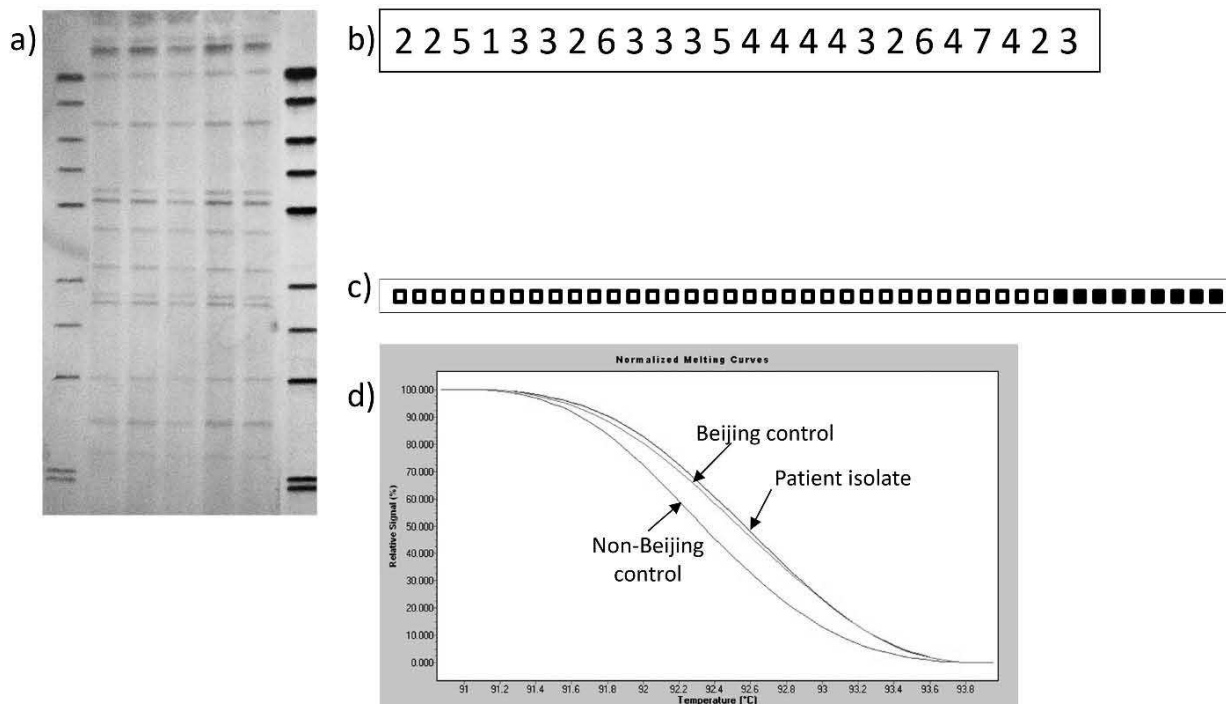


FIG 2 Genotypic characterization of the isolates according to IS6110 RFLP (isolates from 2006, 2006, 2007, 2008, and 2012) (Table 1) (a), MIRU-VNTR (b), spoligotyping (c), and HRM analysis for the Rv2629 SNP for Beijing and non-Beijing controls and for the case isolate (d).

laryngeal tuberculosis (2), which could be the main reason for the outbreak, thus minimizing the role of bacterial factors.

The Beijing lineage is thought to be more prone to resistance than other strains (8). In the present case, the strain always remained pansusceptible despite a long history of treatment interruptions and poor adherence. Acquisition of variability in *M. tuberculosis* can also prove to be advantageous in contexts other than resistance (16, 22), since it can aid in escape from the immune system and in the acquisition of more infective phenotypes (23) and can lead to the emergence of more infective variants. The finding of a potential hypermutator phenotype for Beijing strains (7) could point to a high tendency to accumulate diversity. In the

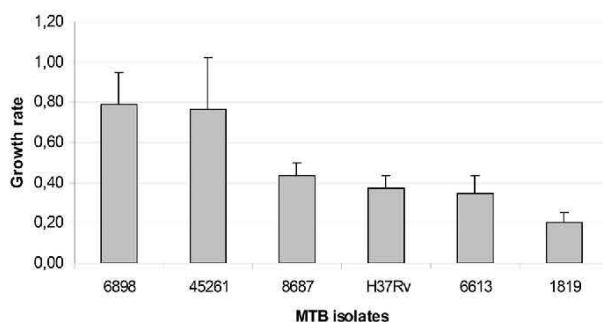


FIG 3 Growth rates of the isolate from the case we report here (6613) and other Beijing strains analyzed previously (4–6, 17). 6898 and 45261 correspond to Beijing virulent strains. H37Rv is also included as a reference.

present case, the lack of an appropriate control precludes a more rigorous analysis of whether the Beijing strain studied has a lower underlying mutation rate, leading to lower variability. However, our findings seem to challenge the assumption that Beijing strains are more prone to acquire variability because, despite the persistent and prolonged active infection, the strain was observed to be extremely stable, even when whole-genome sequencing was applied. Given the high coverage achieved in the whole-genome sequencing analysis ( $715\times$  to  $1,252\times$ ), the power to identify minority variants was very high. Consequently, we were able to rule these variants out with sufficient confidence and no further need to analyze single colonies. A more in-depth analysis of the readings including heterozygous calls and based on 2 independent algorithms enabled us to rule out minority variants in all cases. We found that the present patient had a previous *M. tuberculosis* isolation in 1990 in Barcelona; however, the isolate was unavailable, with the result that it was not possible to expand the genomic analysis backwards.

In summary, we performed an in-depth analysis of a patient with an 8-year history of persistent infection by a Beijing *M. tuberculosis* strain that had previously caused an extensive and prolonged outbreak. None of the advantages generally assumed for such an epidemiologically successful strain were found in our study. In the case we present, the strain did not generate secondary cases, was not virulent, and remained susceptible and extremely stable from a genomic point of view. Our findings suggest that the general assumption of an advantageous microbiological phenotype for specific strains involved in severe outbreaks might not always be correct.



**Data availability.** All sequences are available as a fastq file at EBI under project PRJEB9158.

## ACKNOWLEDGMENTS

We thank Thomas O'Boyle for proofreading the manuscript. We are especially grateful to Juana Gil from the Immunology Department of our hospital for her critical view and extensive discussion of the immunological aspects of this case and for her suggestion to perform additional characterization of the host. We thank M. Isolina Campos-Herrero Navas from the Microbiology Department of Hospital Universitario de Gran Canaria Dr. Negrín, Las Palmas de Gran Canaria, Elena Rodríguez from Servicio de Salud Pública, Área 1, Dirección General de Atención Primaria, Madrid, and José Luis Pérez Arellano from Hospital Insular, Gran Canaria, for the microbiological and epidemiological data of the three cases of infection with the same strain as our case.

This study was supported by Plan Estatal de I+D+I 2013-2016, ISCIII (PI 12/02080) and Fondo Europeo de Desarrollo Regional (FEDER) "Una manera de hacer Europa": Ramón y Cajal Spanish research grant RYC-2012-10627, and MINECO research grant SAF2013-43521-R (to I.C.) and by a PICATA predoctoral fellowship (BE55/11) from the Moncloa Campus of International Excellence (UCM-UPM, Instituto de Investigación Sanitaria Gregorio Marañón) (to Y.N.).

We have no conflicts of interests to declare.

## REFERENCES

- van Soolingen D, Qian L, de Haas PE, Douglas JT, Traore H, Portaels F, Qing HZ, Enkhsaikan D, Nymadawa P, van Embden JD. 1995. Predominance of a single genotype of *Mycobacterium tuberculosis* in countries of east Asia. *J Clin Microbiol* 33:3234–3238.
- Caminero JA, Pena MJ, Campos-Herrero MI, Rodríguez JC, García I, Cabrera P, Lafoz C, Samper S, Takiff H, Afonso O, Pavon JM, Torres MJ, van Soolingen D, Enarson DA, Martin C. 2001. Epidemiological evidence of the spread of a *Mycobacterium tuberculosis* strain of the Beijing genotype on Gran Canaria Island. *Am J Respir Crit Care Med* 164:1165–1170. <http://dx.doi.org/10.1164/ajrccm.164.7.2101031>.
- Pena MJ, Caminero JA, Campos-Herrero MI, Rodríguez-Gallego JC, García-Laorden MJ, Cabrera P, Torres MJ, Lafarga B, Rodríguez de Castro F, Samper S, Canas F, Enarson DA, Martin C. 2003. Epidemiology of tuberculosis on Gran Canaria: a 4 year population study using traditional and molecular approaches. *Thorax* 58:618–622. <http://dx.doi.org/10.1136/thorax.58.7.618>.
- Theus S, Eisenach K, Pomukong N, Silver RF, Cave MD. 2007. Beijing family *Mycobacterium tuberculosis* strains differ in their intracellular growth in THP-1 macrophages. *Int J Tuberc Lung Dis* 11:1087–1093.
- Kato-Maeda M, Shanley CA, Ackart D, Jarlsberg LG, Shang S, Obregon-Henao A, Harton M, Basaraba RJ, Henao-Tamayo M, Barrozo JC, Rose J, Kawamura LM, Coscolla M, Fofanov VY, Koshinsky H, Gagneux S, Hopewell PC, Ordway DJ, Orme IM. 2012. Beijing sublineages of *Mycobacterium tuberculosis* differ in pathogenicity in the guinea pig. *Clin Vaccine Immunol* 19:1227–1237. <http://dx.doi.org/10.1128/CVI.00250-12>.
- Aguilar D, Hanekom M, Mata D, Gey van Pittius NC, van Helden PD, Warren RM, Hernandez-Pando R. 2010. *Mycobacterium tuberculosis* strains with the Beijing genotype demonstrate variability in virulence associated with transmission. *Tuberculosis (Edinb)* 90:319–325. <http://dx.doi.org/10.1016/j.tube.2010.08.004>.
- Ebrahimi-Rad M, Bifani P, Martin C, Kremer K, Samper S, Raubier J, Kreiswirth B, Blazquez J, Jouan M, van Soolingen D, Gicquel B. 2003. Mutations in putative mutator genes of *Mycobacterium tuberculosis* strains of the W-Beijing family. *Emerg Infect Dis* 9:838–845. <http://dx.doi.org/10.3201/eid0907.020803>.
- de Steenwinkel JE, ten Kate MT, de Knecht GJ, Kremer K, Aarnoutse RE, Boeree MJ, Verbrugh HA, van Soolingen D, Bakker-Woudenberg IA. 2012. Drug susceptibility of *Mycobacterium tuberculosis* Beijing genotype and association with MDR TB. *Emerg Infect Dis* 18:660–663. <http://dx.doi.org/10.3201/eid1804.110912>.
- Sologuren I, Boisson-Dupuis S, Pestano J, Vincent QB, Fernandez-Perez L, Chappier A, Cardenas M, Feinberg J, Garcia-Laorden MI, Picard C, Santiago E, Kong X, Janniere L, Colino E, Herrera-Ramos E, Frances A, Navarrete C, Blanche S, Faria E, Remiszewski P, Cordeiro A, Freeman A, Holland S, Abarca K, Valeron-Lemaun M, Goncalo-Marques J, Silveira L, Garcia-Castellano JM, Caminero J, Perez-Arellano JL, Bustamante J, Abel L, Casanova JL, Rodriguez-Gallego C. 2011. Partial recessive IFN-gammaR1 deficiency: genetic, immunological and clinical features of 14 patients from 11 kindreds. *Hum Mol Genet* 20:1509–1523. <http://dx.doi.org/10.1093/hmg/ddr029>.
- de Beaucoudrey L, Samarina A, Bustamante J, Cobat A, Boisson-Dupuis S, Feinberg J, Al-Muhsen S, Janniere L, Rose Y, de Suremain M, Kong XF, Filipe-Santos O, Chappier A, Picard C, Fischer A, Dogu F, Ikinciogullari A, Tanir G, Al-Hajjar S, Al-Jumaah S, Frayha HH, AlSum Z, Al-Ajaji S, Alangari A, Al-Ghoniaim A, Adimi P, Mansouri D, Ben-Mustapha I, Yancoski J, Garty BZ, Rodriguez-Gallego C, Caragol I, Kutukculer N, Kumararatne DS, Patel S, Doffinger R, Exley A, Jeppsson O, Reichenbach J, Nadal D, Boyko Y, Pietrucha B, Anderson S, Levin M, Schandené L, Schepers K, Eflira A, Mascart F, Matsuoaka M, Sakai T, Siegrist CA, et al. 2010. Revisiting human IL-12Rbeta1 deficiency: a survey of 141 patients from 30 countries. *Medicine* 89:381–402. <http://dx.doi.org/10.1097/MD.0b013e3181fdd832>.
- van Embden JD, Cave MD, Crawford JT, Dale JW, Eisenach KD, Gicquel B, Hermans P, Martin C, McAdam R, Shinnick TM, Small PM. 1993. Strain identification of *Mycobacterium tuberculosis* by DNA fingerprinting: recommendations for a standardized methodology. *J Clin Microbiol* 31:406–409.
- Oelemann MC, Diel R, Vatin V, Haas W, Rusch-Gerdes S, Locht C, Niemann S, Supply P. 2007. Assessment of an optimized mycobacterial interspersed repetitive-unit-variable-number tandem-repeat typing system combined with spoligotyping for population-based molecular epidemiology studies of tuberculosis. *J Clin Microbiol* 45:691–697. <http://dx.doi.org/10.1128/JCM.01393-06>.
- Supply P, Allix C, Lesjean S, Cardoso-Oelemann M, Rusch-Gerdes S, Willery E, Savine E, de Haas P, van Deutekom H, Roring S, Bifani P, Kurepina N, Kreiswirth B, Sola C, Rastogi N, Vatin V, Gutierrez MC, Fauville M, Niemann S, Skuce R, Kremer K, Locht C, van Soolingen D. 2006. Proposal for standardization of optimized mycobacterial interspersed repetitive-unit-variable-number tandem repeat typing of *Mycobacterium tuberculosis*. *J Clin Microbiol* 44:4498–4510. <http://dx.doi.org/10.1128/JCM.01392-06>.
- Kamerbeek J, Schouls L, Kolk A, van Agterveld M, van Soolingen D, Kuijper S, Bunschoten A, Molhuizen H, Shaw R, Goyal M, van Embden J. 1997. Simultaneous detection and strain differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* for diagnosis and epidemiology. *J Clin Microbiol* 35:907–914.
- Alonso M, Navarro Y, Barletta F, Martinez Lirola M, Gotuzzo E, Bouza E, Garcia de Viedma D. 2011. A novel method for the rapid and prospective identification of Beijing *Mycobacterium tuberculosis* strains by high-resolution melting analysis. *Clin Microbiol Infect* 17:349–357. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1469-0691.2010.03234.x>.
- Perez-Lago L, Comas I, Navarro Y, Gonzalez-Candelas F, Herranz M, Bouza E, Garcia-de-Viedma D. 2014. Whole genome sequencing analysis of inpatient microevolution in *Mycobacterium tuberculosis*: potential impact on the inference of tuberculosis transmission. *J Infect Dis* 209:98–108. <http://dx.doi.org/10.1093/infdis/jit439>.
- Alonso M, Alonso Rodríguez N, Garzelli C, Martínez Lirola M, Herranz M, Samper S, Ruiz Serrano MJ, Bouza E, García de Viedma D. 2010. Characterization of *Mycobacterium tuberculosis* Beijing isolates from the Mediterranean area. *BMC Microbiol* 10:151. <http://dx.doi.org/10.1186/1471-2180-10-151>.
- Parwati I, van Crevel R, van Soolingen D. 2010. Possible underlying mechanisms for successful emergence of the *Mycobacterium tuberculosis* Beijing genotype strains. *Lancet Infect Dis* 10:103–111. [http://dx.doi.org/10.1016/S1473-3099\(09\)70330-5](http://dx.doi.org/10.1016/S1473-3099(09)70330-5).
- Alonso-Rodríguez N, Martínez-Lirola M, Sánchez ML, Herranz M, Penafiel T, Bonillo Mdel C, González-Rivera M, Martínez J, Cabezas T, Díez-García LF, Bouza E, García de Viedma D. 2009. Prospective universal application of mycobacterial interspersed repetitive-unit-variable-number tandem-repeat genotyping to characterize *Mycobacterium tuberculosis* isolates for fast identification of clustered and orphan cases. *J Clin Microbiol* 47:2026–2032. <http://dx.doi.org/10.1128/JCM.02308-08>.
- Inigo J, Garcia de Viedma D, Arce A, Palenque E, Herranz M, Rodriguez E, Ruiz-Serrano MJ, Bouza E, Chaves F. 2013. Differential findings regarding molecular epidemiology of tuberculosis between

- two consecutive periods in the context of steady increase of immigration. *Clin Microbiol Infect* 19:292–297. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1469-0691.2012.03794.x>.
21. Alonso Rodríguez N, Chaves F, Inigo J, Bouza E, Garcia de Viedma D, Andres S, Cias R, Daza R, Domingo D, Esteban J, Garcia J, Gomez Mampaso E, Herranz M, Palenque E, Ruiz Serrano MJ. 2009. Transmission permeability of tuberculosis involving immigrants, revealed by a multicentre analysis of clusters. *Clin Microbiol Infect* 15:435–442. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1469-0691.2008.02670.x>.
22. Walker TM, Ip CL, Harrell RH, Evans JT, Kapatai G, Dedicoat MJ, Eyre DW, Wilson DJ, Hawkey PM, Crook DW, Parkhill J, Harris D, Walker AS, Bowden R, Monk P, Smith EG, Peto TE. 2013. Whole-genome sequencing to delineate *Mycobacterium tuberculosis* outbreaks: a retrospective observational study. *Lancet Infect Dis* 13:137–146. [http://dx.doi.org/10.1016/S1473-3099\(12\)70277-3](http://dx.doi.org/10.1016/S1473-3099(12)70277-3).
23. Navarro Y, Herranz M, Perez-Lago L, Martinez Lirola M, Indal TB, Ruiz-Serrano MJ, Bouza E, Garcia de Viedma D. 2011. Systematic survey of clonal complexity in tuberculosis at a populational level and detailed characterization of the isolates involved. *J Clin Microbiol* 49:4131–4137. <http://dx.doi.org/10.1128/JCM.05203-11>.

## CAPÍTULO III

### Caracterización de la complejidad clonal en infecciones causadas por *Mycobacterium bovis*

---



La aplicación de las técnicas de genotipado en las infecciones causadas por *Mycobacterium tuberculosis* (MTB) ha permitido desvelar la complejidad clonal existente en la tuberculosis humana. Sin embargo, las lagunas de conocimiento en relación a estos aspectos en el ámbito de la tuberculosis bovina (TBb) son aún muy extensas. Parte de la responsabilidad de esta situación puede deberse al retraso en la implantación de estrategias de genotipado de alta discriminación en la caracterización de los aislados de *Mycobacterium bovis* (*M. bovis*) y *Mycobacterium caprae* (*M. caprae*), en comparación a los ritmos de aplicación de las mismas en MTB. El espoligotipado es aún la técnica de genotipado aplicada mayoritariamente en TBb, método de baja capacidad de discriminación e ineficaz para identificar con precisión infecciones complejas desde un punto de vista clonal.

Los estudios en MTB han demostrado que la técnica de MIRU-VNTR es la única que ofrece una óptima identificación de infecciones mixtas y policlonales y por tanto debería aplicarse en estudios equivalentes en *M. bovis*. Recientemente, esta técnica ha comenzado a utilizarse con fines epidemiológicos sobre aislados de *M. bovis*, principalmente, ofreciendo resultados satisfactorios en cuanto a su poder de discriminación. Sin embargo, aunque existe un panel mínimo definido a nivel europeo, aún no se ha consensuado un panel estandarizado de loci que ofrezca una buena discriminación a nivel global. Además, la aplicación de la técnica en *M. bovis* se apoya en un diseño de PCR simplex y análisis de productos en electroforesis convencional, con asignación manual de valores alélicos. Este método es lento, laborioso y puede comportar imprecisiones en la asignación alélica. Por ello, nuestro primer objetivo fue ajustar la metodología de análisis por MIRU-VNTR en *M. bovis* al formato de alta resolución aplicado en el análisis de complejidad clonal en MTB, basado en PCR multiplex con análisis de productos en electroforesis capilar y asignación automática de alelos. Se seleccionó un panel de 9 loci como el idóneo para ofrecer una elevada discriminación basándonos en un estudio reciente de epidemiología molecular en nuestro país. Este diseño se aplicó en 44 cepas de *M. bovis* y 2 cepas de *M. caprae* aisladas de ganado vacuno, representantes de 14 espoligotipos diferentes. En 45 de las 46 cepas se obtuvo un MIRUtipo completo. Se identificaron 22 MIRUtipos diferentes en la muestra analizada, lo que demuestra el alto poder discriminativo de la técnica, muy superior a los 14 genotipos diferentes ofrecidos por el espoligotipado.

Tras la puesta a punto de una metodología idónea para abordar adecuadamente el fenómeno de las infecciones complejas por *M. bovis*, que a su vez puede tener enorme potencial para optimizar los estudios de epidemiología molecular en TBb, decidimos abordar un primer análisis de complejidad clonal. En el segundo estudio

de este capítulo decidimos focalizarnos en una de las modalidades más extremas, y por tanto infrecuentes, de este tipo de infecciones, la infección compartimentalizada. Esporádicamente se han descrito infecciones de este tipo en TBb, pero, de nuevo, carecemos de estudios sistemáticos con base poblacional que nos permitan conocer la dimensión de estos eventos. En nuestro estudio se seleccionaron todos los animales de una muestra poblacional de Asturias con aislamiento de *M. bovis* en dos o más localizaciones anatómicas diferentes. A pesar de que el espoligotipado es una técnica de baja discriminación, la comparación entre los genotipos obtenidos de 55 animales que cumplieron los criterios de selección desveló que 6 (10,9%) de ellos estaban infectados por cepas diferentes. La aplicación en segunda línea de la técnica MIRU-VNTR confirmó que la compartimentalización era estricta, con una única cepa diferente en cada linfonodo infectado. Finalmente, en uno de los casos se pudo demostrar, mediante genotipado por MIRU-VNTR de aislados adicionales de otros animales infectados de la misma explotación, que la compartimentalización fue originada por una superinfección con cepas que infectaban a animales independientes.

En el tercer estudio incluido en este capítulo nos centramos en otra modalidad de infección compleja, la infección policlonal por variantes clonales que emergen en el seno de una infección por fenómenos de microevolución. Nuestro objetivo era abordar, debido a la existencia de explotaciones infectadas crónicamente por *M. bovis*, un estudio cronológico sistemático y prolongado de la dinámica en la que ocurren estos fenómenos en *M. bovis*, aspecto que no es posible abordar en la infección por MTB. Para este estudio se seleccionaron 8 explotaciones de ganado vacuno infectadas durante más de un año por una misma cepa. Se diseñó un esquema de análisis que se basaba en el genotipado, mediante MIRU-VNTR, de los aislados obtenidos secuencialmente a lo largo de la infección. Tras el genotipado de 88 aislados, se detectó microevolución en la mitad de las explotaciones seleccionadas, involucrando a distintas cepas y loci. Se pudo observar cómo la aparición de variantes clonales es independiente del tiempo de infección y del número de animales infectados. En 2 de las 3 explotaciones en las que se pudo realizar un seguimiento posterior a la emergencia de la variante generada por microevolución, esta reemplazó a la cepa inicial, indicando una mayor aptitud infectiva.

Finalmente, este estudio puede considerarse como un modelo de estudio de la variabilidad que se puede adquirir por microevolución, desde el punto de vista de los marcadores MIRU-VNTR, en la infección por *M. bovis*. Estos datos son de utilidad para identificar la variabilidad que puede llegar a adquirir una cepa en condiciones de infección persistente y permiten proponer los umbrales de variabilidad que debe ser tolerado para asegurar que las variantes clonales, que se detecten en estudios

epidemiológicos, no sean incorrectamente interpretadas como aislamientos no relacionados. A partir de los resultados de nuestro estudio, y a falta de estudios adicionales que ayuden a refinar el punto de corte, se podría proponer tolerar diferencias de hasta tres repeticiones en un locus hipervariable o dos en uno estable, cuando se maneje el panel completo de 26 loci.

En conclusión, los estudios realizados en cepas de *M. bovis*, aisladas de ganado vacuno, han permitido desvelar la existencia de infecciones clonalmente complejas en esta población. La optimización de la técnica de MIRU-VNTR, llevada a cabo en esta tesis, ofrece un formato idóneo para el estudio de la complejidad clonal que puede ser asimismo adaptado a estudios de epidemiología molecular. La compartimentalización y la microevolución en la TBb son eventos que ocurren con mayor frecuencia de la esperada. La microevolución en *M. bovis* puede conducir a la emergencia de variantes clonales que pueden sustituir en la población a las cepas parentales. La complejidad clonal en la TBb debe ser considerada para asegurar una correcta interpretación de los resultados en los estudios epidemiológicos y así lograr un buen control y erradicación de la enfermedad







Contents lists available at ScienceDirect

## Research in Veterinary Science

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/rvsc](http://www.elsevier.com/locate/rvsc)

## High-throughput multiplex MIRU-VNTR typing of *Mycobacterium bovis*



Y. Navarro <sup>a,b,c,d,e</sup>, M. Herranz <sup>a,b,e</sup>, B. Romero <sup>c,d</sup>, E. Bouza <sup>a,b,e,f</sup>, L. Domínguez <sup>c,d,g</sup>,  
L. de Juan <sup>c,d,g</sup>, D. García-de-Viedma <sup>a,b,d,e,\*</sup>

<sup>a</sup> Servicio Microbiología Clínica y Enfermedades Infecciosas, Hospital General Universitario Gregorio Marañón, Madrid, Spain

<sup>b</sup> Instituto de Investigación Sanitaria Gregorio Marañón, Madrid, Spain

<sup>c</sup> Centro de Vigilancia Sanitaria Veterinaria (VISAVET), Universidad Complutense, Madrid, Spain

<sup>d</sup> CEI Campus Moncloa, UCM-UPM, Madrid, Spain

<sup>e</sup> CIBER Enfermedades Respiratorias, CIBERES, Spain

<sup>f</sup> Departamento de Medicina, Facultad de Medicina, Universidad Complutense, Madrid, Spain

<sup>g</sup> Departamento de Sanidad Animal, Facultad de Veterinaria, Universidad Complutense, Madrid, Spain

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 29 November 2013

Accepted 20 March 2014

#### Keywords:

*Mycobacterium bovis*

MIRU-VNTR typing

Multiplex

Genotyping

### ABSTRACT

Spoligotyping is the most widely used method for genotyping *Mycobacterium bovis* (*M. bovis*). However, its discriminatory power varies widely between countries. MIRU-VNTR typing could be a promising alternative, although it generally requires the time consuming and laborious simplex PCR assays using standard agarose gel electrophoresis. The accuracy of this approach depends on good standardization and a certain degree of expertise. This study presents a version of MIRU-VNTR based on three triplex PCRs with automatic allelic assignment of the products analyzed in capillary electrophoresis. The technique was prospectively applied to 44 *M. bovis* and two *Mycobacterium caprae* (*M. caprae*) isolates, and 22 different MIRU-VNTR types were obtained; with spoligotyping, only 14 different types were obtained. The proposal makes it possible to shorten response times, automate procedures, and increase accuracy, thus minimizing errors in assigning genotypes. It would enable the switch from a standard limited method of genotyping *M. bovis* to a high-throughput discriminatory fingerprinting approach.

© 2014 Elsevier Ltd. All rights reserved.

*Mycobacterium bovis* (*M. bovis*) is the main causative agent of bovine tuberculosis (bTB) and can affect both wild and domestic animals. Zoonotic transmission of this pathogen is by contact with infected animals or consumption of contaminated animal products, such as unpasteurized milk. The incidence of human tuberculosis (TB) caused by *M. bovis* is low in countries with bTB control programs (Hlavsa et al., 2008; Pavlik et al., 2004; Rodriguez et al., 2009) and higher in countries where resources are insufficient to implement bTB programs (Ayele et al., 2004; Malama et al., 2013; Muller et al., 2013). Person-to-person transmission events have also been reported (Evans et al., 2007; Sunder et al., 2009).

Genotyping tools can provide detailed information on the epidemiology of infection by *M. bovis*. Direct variable repeat spoligotyping is the most commonly used technique, although its discriminatory power varies widely between countries and even geographical regions, with the best results in Portugal (Duarte et al., 2008), Italy (Boniotti et al., 2009), Spain (Rodriguez et al., 2010), or South Africa (Michel et al., 2008), and poor results in the United

Kingdom (Hewinson et al., 2006; Skuce et al., 2005) or Northern Ireland (Costello et al., 1999). This variability in the discriminatory power of spoligotyping has obliged us to investigate new alternatives for genotyping *M. bovis*. In *Mycobacterium tuberculosis* (MTB), the 24-loci mycobacterium interspersed repetitive units variable-number tandem repeat (MIRU-VNTR) has produced good results and is the current reference method for surveying transmission events involving this entity (Sloot et al., 2013; Supply et al., 2006). Similarly, VNTR typing has been considered the most suitable method, either to complement spoligotyping or as an alternative to it, when high discriminatory power between *M. bovis* strains in molecular epidemiology programs is sought (Boniotti et al., 2009; Rodriguez-Campos et al., 2011). However, a standardized panel of loci assuring high discriminatory power at a global geographical level is not yet achievable in *M. bovis*, as it is in MTB. Different sets of loci have been found to be suitable for specific countries (Boniotti et al., 2009; Duarte et al., 2010; McLernon et al., 2010). In Spain, a nine-loci set with reasonably high discriminatory power was reported when the technique was used to investigate the most prevalent genotype, SB0121 (Rodriguez-Campos et al., 2013). Six of these loci (ETR-A, ETR-B, MIRU 4, QUB 11a, QUB 11b, and VNTR 3232) were recommended by the VENoMYC consortium (EU Coordination Action

\* Corresponding author. Tel.: +34914 265104; fax: 915044906.  
E-mail address: [dgriedma2@gmail.com](mailto:dgriedma2@gmail.com) (D. García-de-Viedma).



SSPE-CT-2004–501903) (Supply, 2006), and the remaining three [MIRU 31, MIRU 26 (Gortazar et al., 2005) and QUB 26 (Romero et al., 2008)] were successfully used to type Spanish strains.

MIRU-VNTR-based studies with *M. bovis* were based on independent simplex PCRs and, in the great majority of them, sizing of the amplification products using standard agarose gel electrophoresis. This method is time consuming and laborious, and accurate sizing depends on good standardization of products and the expertise of the technician. The procedure can be affected by mistakes in allelic assignment and also by the manual transcription of values. In the case of MTB, it has been demonstrated that a high-throughput multiplex PCR assay, followed by sizing of the amplicons using capillary electrophoresis and automatic assignment of allelic values, is the best approach to ensuring highly accurate fingerprinting (de Beer et al., 2012); moreover it reduces workload. In *M. bovis*, only one study (Allix et al., 2006) has adapted MIRU-VNTR-based genotyping to a high-throughput format, although the protocol which had been proposed for MTB typing was replicated directly for *M. bovis* fingerprinting, without selecting the more suitable loci and tailoring the design to the specific requirements of *M. bovis*. Our aim was to design and evaluate a high-throughput multiplex procedure adapted specifically to *M. bovis* using a nine-loci set, the majority corresponding to those applied worldwide. This nine-loci set has proven to be highly efficient in our laboratory.

The study was carried out in 44 *M. bovis* isolates from cattle (*Bos taurus*,  $n = 40$ ), wild boar (*Sus scrofa*,  $n = 2$ ), pig (*Sus scrofa*,  $n = 1$ ), and goat (*Capra hircus*,  $n = 1$ ) and in two *Mycobacterium caprae* (*M. caprae*) isolates from cattle. The isolates were randomly selected over 3 months (15th September to 15th December, 2012) from 100 positive media used to culture tissue samples processed at the VISAVET Health Surveillance Centre.

The tissue of each animal was homogenized with sterile distilled water, decontaminated with 0.35% hexadecylpyridinium chloride for 30 min, centrifuged at 1500 g for 30 min, and cultured onto Coletos and 1% (wt/vol) pyruvate-enriched Lowenstein–Jensen media (Difco FSM, Madrid, Spain) at 37 °C. The isolates were both identified and genotyped using spoligotyping according to the protocol described by Kamerbeek et al. (1997). For the multiplex PCR assay, DNA was extracted from Lowenstein–Jensen slants using a column-based purification method (QIAamp DNA Mini Kit protocol; Qiagen, Courtaboeuf, France) in accordance with the manufacturer's instructions. DNA was eluted in 70 µL of buffer AE and diluted at 10 ng/µL.

The MIRU-VNTR combinations of the loci selected for *M. bovis* (Rodríguez-Campos et al., 2013) for each of the three triplex PCRs were defined using as a reference their distribution in the MIRU 24-loci set applied in MTB (Supply et al., 2006). Therefore, MIRU 4 and MIRU 26 and QUB 11b and QUB 26 were kept for mixes 1 and 2, respectively. We selected two loci in mix 3, QUB 11a and VNTR 3232, which were not included in the MTB MIRU24 set. Regarding VNTR 3232, two different pairs of oligonucleotides were used (two annealing [3188927–3189629] within the region delimited by the other pair [3189107–3189567], coordinates using *M. bovis* AF2122/97 as a reference), and the best results were obtained with the pair annealing closer together. The selection of the third locus completing each multiplex mix was supported on the Tm values of the corresponding primers, to assure that all the primers in a mix shared similar Tm. Different options were tested experimentally by assaying four different previously genotyped DNAs with different amounts of Q solution (5 µL was finally added) and using the intensity of the amplification products in an agarose gel and the lack of nonspecific amplifications as evaluation criteria. To complete mix 1, we tested both MIRU 31 and ETR-A and selected MIRU 31. For mixes 2 and 3, the best options were ETR-B and ETR-A, respectively. Finally, one oligonucleotide from each pair was fluorescence labeled (Fig. 1)

**Table 1**

Genotyping results of 46 isolates. Order of loci: MIRU 4, MIRU 26, MIRU 31, QUB 11b, ETR-B, QUB 26, QUB 11a, VNTR 3232 and ETR-A.  $n$  indicates the number of isolates sharing the pattern.

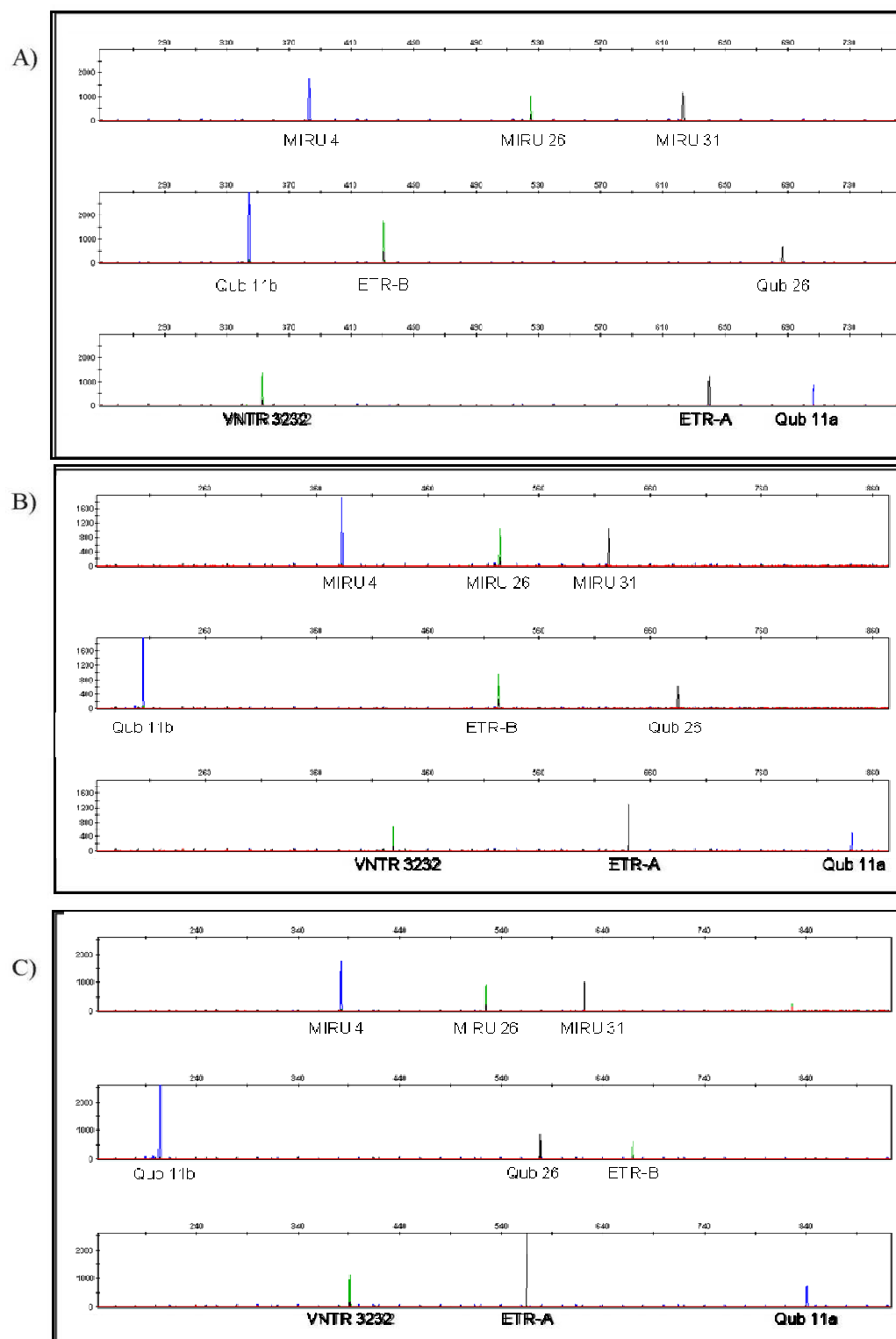
Spoligotype ( $n$ )	MIRU-VNTRtype ( $n$ )	Species
SB0119 (2)	25 3 2 3 5 10 7 6 (2)	<i>M. bovis</i>
SB0121 (15)	36 3 2 4 5 10 7 5 (4)	<i>M. bovis</i>
	45 3 2 4 5 10 9 4 (4)	<i>M. bovis</i>
	35 3 2 4 6 10 7 6 (3)	<i>M. bovis</i>
	36 3 2 4 5 10 7 6 (1)	<i>M. bovis</i>
	31 3 2 2 5 10 7 6 (1)	<i>M. bovis</i>
	45 3 2 4 5 10 9 4 (1)	<i>M. bovis</i>
	32 3 2 4 5 10 8 4 (1)	<i>M. bovis</i>
SB0124 (3)	32 3 2 4 5 10 10 6 (3)	<i>M. bovis</i>
SB0134 (2)	34 3 4 5 5 9 5 3 (1)	<i>M. bovis</i>
	35 3 4 2 5 8 5 6 (1)	<i>M. bovis</i>
SB0157 (1)	45 2 2 3 2 5 – 4 (1)	<i>M. caprae</i>
SB0265 (2)	35 3 2 4 4 8 6 5 (1)	<i>M. bovis</i>
	35 3 2 7 4 10 6 5 (1)	<i>M. bovis</i>
SB0295 (5)	35 3 2 4 5 10 7 6 (3)	<i>M. bovis</i>
	35 3 2 3 5 6 7 6 (1)	<i>M. bovis</i>
	35 3 2 4 5 10 13 6 (1)	<i>M. bovis</i>
SB0339 (8)	35 3 2 4 5 10 7 5 (6)	<i>M. bovis</i>
	35 3 1 4 5 10 7 3 (1)	<i>M. bovis</i>
	35 3 3 4 5 10 9 6 (1)	<i>M. bovis</i>
SB0948 (1)	35 3 2 5 5 10 6 4 (1)	<i>M. bovis</i>
SB1081 (1)	45 2 2 3 2 5 8 4 (1)	<i>M. caprae</i>
SB1142 (2)	35 3 2 4 5 10 8 4 (2)	<i>M. bovis</i>
SB1336 (1)	36 3 2 4 5 10 7 5 (1)	<i>M. bovis</i>
SB1624 (2)	35 3 2 4 5 10 7 6 (2)	<i>M. bovis</i>
SB1981 (1)	35 3 2 4 5 10 7 5 (1)	<i>M. bovis</i>

Multiplex PCR assays were carried out by adding 5 µL of DNA to a final reaction mixture of 50 µL, including 25 µL of PCR master mix (Qiagen Multiplex PCR Kit, Qiagen, Hilden, Germany). The thermocycling conditions were 15 min at 95 °C followed by 20 denaturation cycles at 95 °C for 50 s, 58 °C for 60 s, an extension at 72 °C for 1.5 min, and a final extension for 7 min at 72 °C. The amplicons were sized in an ABI Prism 3100 genetic analyzer (Applied Biosystems, NLLab Centraal B.V., Haarlem, The Netherlands). Allelic values were assigned using GeneMapper 4.0 (Applied Biosystems, Foster City, California, USA).

A complete MIRU-VNTR type was obtained in 45 of the 46 isolates (Table 1). One locus (VNTR 3232) from one isolate could not be amplified even after trying a simplex amplification of that locus. This isolate corresponded to *M. caprae*, and although some authors were able to analyze this species (Duarte et al., 2010), (the second *M. caprae* included in our sample was amplified) others were unsuccessful (Prodingier et al., 2005; Rodríguez et al., 2011). The VNTR 3232 locus is considered as hypervariable, and this feature could be responsible for the amplification problems observed, as has been reported for another locus of this kind (Supply et al., 2006). We cannot rule out the potential role of a sequence variation in the annealing region of the primers. In any case very little experience has been acquired with this species (Prodingier et al., 2005).

MIRU-VNTR increased the discriminatory power of spoligotyping, according to previous studies (Rodríguez-Campos et al., 2013). The 14 spoligotypes were split into 22 different MIRU-VNTR types. Since MIRU-VNTR is still not used as a routine fingerprinting technique for *M. bovis* in all laboratories, additional studies are needed before precising its discriminatory power in different settings/profiles of circulant strains.

The same philosophy applied in this study, of tailoring a limited set of multiplex PCRs which is adapted to the specificities of the *M. bovis* strains prevalent in our context, must be replicated in those settings with differences in the profile of circulant strains, to find equivalently efficient and fast fingerprinting schemes. Finally, in certain situations in which the presence of a highly prevalent *M. bovis* genotype is known, such as SB0121 in Spain, a more reduced set of



**Fig. 1.** Electropherograms corresponding to the multiplex PCRs for three representative isolates. MIRU 4, QUB 11b and QUB 11a correspond to blue peaks; MIRU 26, ETR-B, VNTR 3232 to green peaks; and MIRU 31, QUB 26 and ETR-A to black peaks. (A) MIRU-VNTRtype 3 5 3 4 2 5 8 5 6 (SB0134), (B) MIRU-VNTRtype 3 5 3 4 2 5 10 7 6 (SB0295), (C) MIRU-VNTRtype 3 5 3 2 7 4 10 6 5 (SB0265). (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)



loci can be enough to achieve a reasonable discriminatory power (Rodríguez-Campos et al., 2013), which would allow the application of an even easier and more cost-effective first-line screening scheme based on only one or two multiplex PCRs. For the composition of circulant strains found in Spain, with SB0121 as the prevalent genotype, the mix 3, composed by three of the four most discriminatory loci for SB121, should be the one selected if only one mix is to be applied. If a higher discrimination is needed, mix 2, which includes the third and fifth more discriminatory loci (Rodríguez-Campos et al., 2013) might be included.

It is highly likely that MIRU-VNTR will become the reference method for genotyping of *M. bovis*/*M. caprae*. The multiplex PCR version for MIRU-VNTR analysis presented here is suitable as a systematic routine tool and would enable the switch from a standard limited method of genotyping *M. bovis* to high-throughput discriminatory fingerprinting. The new approach will make it possible to shorten response times, automate procedures, and increase accuracy, thus minimizing errors in assigning genotypes.

## Acknowledgments

This work was supported by Fondo de Investigaciones Sanitarias (FIS S09/02205, PI12/02080). Research by Yurena Navarro was partly supported by a PICATA predoctoral fellowship (BE55/11) from the Moncloa Campus of International Excellence (UCM-UPM, Instituto de Investigación Sanitaria Gregorio Marañón). We are grateful to Milagros González for her participation in the sequencing analysis. We are grateful to Thomas O'Boyle for proofreading the manuscript.

## References

- Allix, C., Walravens, K., Saegerman, C., Godfroid, J., Supply, P., Fauville-Dufaux, M., 2006. Evaluation of the epidemiological relevance of variable-number tandem-repeat genotyping of *Mycobacterium bovis* and comparison of the method with IS6110 restriction fragment length polymorphism analysis and spoligotyping. *Journal of Clinical Microbiology* 44, 1951–1962.
- Ayele, W.Y., Neill, S.D., Zinsstag, J., Weiss, M.G., Pavlik, I., 2004. Bovine tuberculosis: An old disease but a new threat to Africa. *The International Journal of Tuberculosis and Lung Disease* 8, 924–937.
- Boniotti, M.B., Goria, M., Loda, D., Garrone, A., Benedetto, A., Mondo, A., et al., 2009. Molecular typing of *Mycobacterium bovis* strains isolated in Italy from 2000 to 2006 and evaluation of variable-number tandem repeats for geographically optimized genotyping. *Journal of Clinical Microbiology* 47, 636–644.
- Costello, E., O'Grady, D., Flynn, O., O'Brien, R., Rogers, M., Quigley, F., et al., 1999. Study of restriction fragment length polymorphism analysis and spoligotyping for epidemiological investigation of *Mycobacterium bovis* infection. *Journal of Clinical Microbiology* 37, 3217–3222.
- de Beer, J.L., Kremer, K., Kodmon, C., Supply, P., van Soolingen, D., 2012. First worldwide proficiency study on variable-number tandem-repeat typing of *Mycobacterium tuberculosis* complex strains. *Journal of Clinical Microbiology* 50, 662–669.
- Duarte, E.L., Domingos, M., Amado, A., Botelho, A., 2008. Spoligotype diversity of *Mycobacterium bovis* and *Mycobacterium caprae* animal isolates. *Veterinary Microbiology* 130, 415–421.
- Duarte, E.L., Domingos, M., Amado, A., Cunha, M.V., Botelho, A., 2010. MIRU-VNTR typing adds discriminatory value to groups of *Mycobacterium bovis* and *Mycobacterium caprae* strains defined by spoligotyping. *Veterinary Microbiology* 143, 299–306.
- Evans, J.T., Smith, E.G., Banerjee, A., Smith, R.M., Dale, J., Innes, J.A., et al., 2007. Cluster of human tuberculosis caused by *Mycobacterium bovis*: Evidence for person-to-person transmission in the UK. *Lancet* 369, 1270–1276.
- Gortazar, C., Vicente, J., Samper, S., Garrido, J.M., Fernandez-De-Mera, I.G., Gavin, P., et al., 2005. Molecular characterization of *Mycobacterium tuberculosis* complex isolates from wild ungulates in south-central Spain. *Veterinary Research* 36, 43–52.
- Hewinson, R.G., Vordermeier, H.M., Smith, N.H., Gordon, S.V., 2006. Recent advances in our knowledge of *Mycobacterium bovis*: A feeling for the organism. *Veterinary Microbiology* 112, 127–139.
- Hlavsa, M.C., Moonan, P.K., Cowan, L.S., Navin, T.R., Kammerer, J.S., Morlock, G.P., et al., 2008. Human tuberculosis due to *Mycobacterium bovis* in the United States, 1995–2005. *Clinical Infectious Diseases* 47, 168–175.
- Kamerbeek, J., Schouls, L., Kolk, A., van Agterveld, M., van Soolingen, D., Kuijper, S., et al., 1997. Simultaneous detection and strain differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* for diagnosis and epidemiology. *Journal of Clinical Microbiology* 35, 907–914.
- Malama, S., Muma, J.B., Godfroid, J., 2013. A review of tuberculosis at the wildlife-livestock-human interface in Zambia. *Infectious Diseases of Poverty* 2, 13.
- McLernon, J., Costello, E., Flynn, O., Madigan, G., Ryan, F., 2010. Evaluation of mycobacterial interspersed repetitive-unit-variable-number tandem-repeat analysis and spoligotyping for genotyping of *Mycobacterium bovis* isolates and a comparison with restriction fragment length polymorphism typing. *Journal of Clinical Microbiology* 48, 4541–4545.
- Michel, A.L., Hlokwé, T.M., Coetzee, M.L., Mare, L., Connaway, L., Rutten, V.P., et al., 2008. High *Mycobacterium bovis* genetic diversity in a low prevalence setting. *Veterinary Microbiology* 126, 151–159.
- Muller, B., Durr, S., Alonso, S., Hattendorf, J., Laisse, C.J., Parsons, S.D., et al., 2013. Zoonotic *Mycobacterium bovis*-induced tuberculosis in humans. *Emerging Infectious Diseases* 19, 899–908.
- Pavlik, I., Ayele, W.Y., Havelkova, M., Svejnochova, M., Katalinic-Jankovic, V., Zolnir-Dovc, M., 2004. *Mycobacterium bovis* infection in human population in four Central European countries during 1990–1999. *Veterinarni Medicina* 48, 90–98.
- Proding, W.M., Brandstatter, A., Naumann, L., Pacciarini, M., Kubica, T., Boschirol, M.L., et al., 2005. Characterization of *Mycobacterium caprae* isolates from Europe by mycobacterial interspersed repetitive unit genotyping. *Journal of Clinical Microbiology* 43, 4984–4992.
- Rodríguez, E., Sánchez, L.P., Pérez, S., Herrera, L., Jiménez, M.S., Samper, S., et al., 2009. Human tuberculosis due to *Mycobacterium bovis* and *M. caprae* in Spain, 2004–2007. *The International Journal of Tuberculosis and Lung Disease* 13, 1536–1541.
- Rodríguez, S., Romero, B., Bezos, J., de Juan, L., Álvarez, J., Castellanos, E., et al., 2010. High spoligotype diversity within a *Mycobacterium bovis* population: Clues to understanding the demography of the pathogen in Europe. *Veterinary Microbiology* 141, 89–95.
- Rodríguez, S., Bezos, J., Romero, B., de Juan, L., Álvarez, J., Castellanos, E., et al., 2011. *Mycobacterium caprae* infection in livestock and wildlife, Spain. *Emerging Infectious Diseases* 17, 532–535.
- Rodríguez-Campos, S., Aranaz, A., de Juan, L., Saez-Llorente, J.L., Romero, B., Bezos, J., et al., 2011. Limitations of spoligotyping and variable-number tandem-repeat typing for molecular tracing of *Mycobacterium bovis* in a high-diversity setting. *Journal of Clinical Microbiology* 49, 3361–3364.
- Rodríguez-Campos, S., Navarro, Y., Romero, B., de Juan, L., Bezos, J., Mateos, A., et al., 2013. Splitting of a prevalent *Mycobacterium bovis* spoligotype by variable number tandem repeat typing reveals high heterogeneity in an evolving clonal group. *Journal of Clinical Microbiology* 51, 3658–3665.
- Romero, B., Aranaz, A., Sandoval, A., Álvarez, J., de Juan, L., Bezos, J., et al., 2008. Persistence and molecular evolution of *Mycobacterium bovis* population from cattle and wildlife in Doñana National Park revealed by genotype variation. *Veterinary Microbiology* 132, 87–95.
- Skuce, R.A., McDowell, S.W., Mallon, T.R., Luke, B., Breadon, E.L., Lagan, P.L., et al., 2005. Discrimination of isolates of *Mycobacterium bovis* in Northern Ireland on the basis of variable numbers of tandem repeats (VNTRs). *The Veterinary Record* 157, 501–504.
- Sloot, R., Borgdorff, M.W., de Beer, J.L., van Ingen, J., Supply, P., van Soolingen, D., 2013. Clustering of tuberculosis cases based on variable-number tandem-repeat typing in relation to the population structure of *Mycobacterium tuberculosis* in the Netherlands. *Journal of Clinical Microbiology* 51, 2427–2431.
- Sunder, S., Lanotte, P., Godreuil, S., Martin, C., Boschirol, M.L., Besnier, J.M., 2009. Human-to-human transmission of tuberculosis caused by *Mycobacterium bovis* in immunocompetent patients. *Journal of Clinical Microbiology* 47, 1249–1251.
- Supply, P., 2006. Protocol and Guidelines for Multilocus Variable Number Tandem Repeat Genotyping of *M. bovis* VENoMYC (Veterinary Network of Laboratories Researching into Improved Diagnosis and Epidemiology of Mycobacterial Diseases) WP7 Workshop, Toledo, Spain, pp. 15–16. October 19–22 2006. WP7 Workshop VENoMYC Coordination Action EU SSPE-CT-2004-501903.
- Supply, P., Allix, C., Lesjean, S., Cardoso-Oelemann, M., Rusch-Gerdes, S., Willery, E., et al., 2006. Proposal for standardization of optimized mycobacterial interspersed repetitive unit-variable-number tandem repeat typing of *Mycobacterium tuberculosis*. *Journal of Clinical Microbiology* 44, 4498–4510.





Contents lists available at ScienceDirect

## Veterinary Microbiology

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/vetmic](http://www.elsevier.com/locate/vetmic)

## Multiple sampling and discriminatory fingerprinting reveals clonally complex and compartmentalized infections by *M. bovis* in cattle



Yurena Navarro<sup>a,b,c,d,e</sup>, Beatriz Romero<sup>d,e</sup>, María Francisca Copano<sup>f</sup>,  
Emilio Bouza<sup>a,b,c,g</sup>, Lucas Domínguez<sup>d,e,h</sup>, Lucía de Juan<sup>d,e,h</sup>,  
Darío García-de-Viedma<sup>a,b,c,d,\*</sup>

<sup>a</sup>Servicio Microbiología Clínica y Enfermedades Infecciosas, Hospital General Universitario Gregorio Marañón, Madrid, Spain

<sup>b</sup>Instituto de Investigación Sanitaria Gregorio Marañón, Madrid, Spain

<sup>c</sup>CIBER Enfermedades respiratorias CIBERES, Spain

<sup>d</sup>CEI Campus Moncloa, UCM-UPM, Madrid, Spain

<sup>e</sup>Centro de Vigilancia Sanitaria Veterinaria (VISAVET), Universidad Complutense Madrid, 28040 Madrid, Spain

<sup>f</sup>Laboratorio de Sanidad Animal del Principado de Asturias, 33299 Gijón, Spain

<sup>g</sup>Departamento de Medicina, Facultad de Medicina, Universidad Complutense de Madrid, Madrid, Spain

<sup>h</sup>Departamento de Sanidad Animal, Facultad de Veterinaria, Universidad Complutense Madrid, 28040 Madrid, Spain

## ARTICLE INFO

## Article history:

Received 18 September 2014

Received in revised form 27 October 2014

Accepted 2 November 2014

## Keywords:

*M. bovis*

Coinfection

Compartmentalization

Clonal complexity

Microevolution

## ABSTRACT

The combination of new genotyping tools and a more exhaustive sampling policy in the analysis of infection by *Mycobacterium tuberculosis* has shown that infection by this pathogen is more complex than initially expected. Mixed infections, coexistence of clonal variants from a parental strain, and compartmentalized infections are all different modalities of this clonal complexity. Until recently, genotyping of *Mycobacterium bovis* in animal populations was based on spoligotyping and analysis of a single isolate per infection; therefore, clonal complexity is probably underdetected. We used multiple sampling combined with highly discriminatory MIRU-VNTR to study compartmentalized infections by *M. bovis* in a low-tuberculosis prevalence setting. We spoligotyped the *M. bovis* isolates from two or more anatomic locations sampled from 55 animals on 39 independent farms. Compartmentalized infections, with two different strains infecting independent lymph nodes in the same animal, were found in six cases (10.9%). MIRU-VNTR analysis confirmed that the compartmentalization was strict and that only one strain was present in each infected node. MIRU-VNTR analysis of additional infected animals on one of the farms confirmed that the compartmentalized infection was a consequence of superinfection, since the two strains were independently infecting other animals. This same analysis revealed the emergence of a microevolved clonal variant in one of the lymph nodes of the compartmentalized animal. Clonal complexity must also be taken into consideration in *M. bovis* infection, even in low-prevalence settings, and analyses must be adapted to detect it and increase the accuracy of molecular epidemiology studies.

© 2014 Elsevier B.V. All rights reserved.

\* Corresponding author at: Servicio de Microbiología y Enfermedades Infecciosas, Hospital General Universitario Gregorio Marañón, Instituto de Investigación Sanitaria Gregorio Marañón, C/Dr Esquerdo 46, 28007 Madrid, Spain. Tel.: +34 914265104; fax: +34 91 5044906.

E-mail address: [dgviedma2@gmail.com](mailto:dgviedma2@gmail.com) (D. García-de-Viedma).



Bovine tuberculosis (bTB) generates a considerable economic and health burden, thus justifying strict epidemiological surveys for monitoring and control. Studies of the molecular epidemiology of infection by *Mycobacterium bovis* have increased our knowledge of the transmission dynamics of this pathogen (Costello et al., 1999; McCluskey et al., 2014) on farms, in the natural environment, and between both settings and have facilitated the design of control programs.

The application of molecular fingerprinting to the analysis of *Mycobacterium tuberculosis* (MTB) infections has shown that the infection by this pathogen is more clonally complex than initially expected. Infections by more than one MTB strain and compartmentalized infections with different strains at independent anatomical sites in the same patient have been described (Muwonge et al., 2013; Navarro et al., 2011). We recorded these findings after improving our sampling schemes and applying MIRU-VNTR (mycobacterial interspersed repetitive units-variable number of tandem repeats), which is particularly sensitive to detect coinfecting strains, even if they are under-represented (García de Viedma et al., 2005). Accurate identification of infections involving more than one strain or clonal variant and its potentially asymmetric distribution in different tissues has enabled us to more accurately track the dynamics of MTB transmission and increase our knowledge of the complex patterns of MTB infection.

However, the issue of clonal complexity has received little attention in animals infected by *M. bovis*. Standard molecular epidemiology studies of *M. bovis* are based on DVR-spoligotyping (Cunha et al., 2012; Mwakapuja et al., 2013), a hybridization-based approach that is unable to identify mixed infections. This limitation is aggravated by the common habit of genotyping isolates from a pool of tissues from a single animal. Both limitations could explain why clonal complexity is underdetected in infection by *M. bovis*.

Our aim was to apply the multiple-sampling with refined analysis by MIRU-VNTR strategy, used to analyze clonal complexity in MTB infections, to animals infected by *M. bovis* in order to identify and analyze clonally complex events associated with this pathogen.

## 1. Materials and methods

### 1.1. Study samples

The study sample comprised 154 animals diagnosed with bTB (based on the intradermal tuberculin test) between January 2007 and December 2008 from 74 cattle farms in the autonomous community of Asturias in northern Spain. Samples were processed according to the pattern of macroscopic lesions found in each carcass. When lesions were observed, the involved lymph node/s (mediastinal, tracheobronchial, and/or retropharyngeal) and/or the lungs were taken and cultured separately. When lesions were not observed, each lymph node and a pool of the lymph nodes (mix) were cultured separately.

Animals with  $\geq$  two positive cultures from different samples were selected for the study of clonal complexity.

### 1.2. Bacterial procedures and DNA extraction

Lymph nodes were homogenized separately, decontaminated, and cultured in Coletsos, Lowenstein-Jensen with pyruvate or MGIT (Mycobacterial-Growth-Indicator-Tube) media. Pelleted cultures were boiled to extract the DNA and identify the isolates as *M. bovis* by spoligotyping.

For MIRU-VNTR typing, purification of the extracted DNA from boiled specimens was needed. We used a column-based purification method (QIAamp DNA Mini Kit protocol; Qiagen, Courtaboeuf, France) without the proteinase K step. Samples were finally eluted in 70  $\mu$ l of buffer AE.

### 1.3. Genotyping analysis

#### 1.3.1. DVR-spoligotyping

The isolates were spoligotyped following the protocol described by Kamerbeek (Kamerbeek et al., 1997). Spoligotyping profiles were assigned according a standard nomenclature ([www.mbovis.org](http://www.mbovis.org)) (Smith and Upton, 2012).

#### 1.3.2. MIRU-VNTR typing

Standard panel of nine loci: the nine MIRU-VNTR loci (VNTR 580 [MIRU 4], VNTR 2996 [MIRU 26], VNTR 3192 [MIRU 31], VNTR 2163b [QUB-11b], VNTR 2461 [ETR-B], VNTR 4052 [QUB-26], VNTR 2163a [QUB-11a], VNTR 3232 [QUB-3232], VNTR 2165 [ETR-A]) defined as optimum for typing of *M. bovis* (Rodríguez-Campos et al., 2013) were selected for analysis using multiplex PCR (Navarro et al., 2014). Five microliters of non-diluted DNA were added to a final reaction mixture of 50  $\mu$ l. MIRU-VNTR types were obtained by sizing amplicons in an ABI Prism 3100 genetic analyzer (Applied Biosystems, NLLab Centraal B.V., Haarlem, The Netherlands) and assigning allelic values using GeneMapper 4.0 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA).

Extended panel of 24 loci: in cases showing differences in the nine MIRU-VNTR analysis, we continued the analysis to complete the 24 loci in the extended set, using simplex PCR and agarose electrophoresis (Navarro et al., 2011).

## 2. Results

### 2.1. Screening of clonal complexity by multiple sampling and spoligotyping

We diagnosed bTB in 154 animals from 74 cattle farms. In 64 animals (41.5%), lesions were observed at  $\geq$  two locations and were therefore independently sampled and cultured. The cultured isolates were from lymph nodes (mediastinal [51 animals], tracheobronchial [42 animals], retropharyngeal [15 animals]) and lung tissue (six animals). Spoligotyping of  $\geq$  two isolates from the same animal was performed in 55 cases. The spoligotypes obtained were as follows: SB0120, SB0121, SB0130, SB0134, SB0140, SB0265, SB0329, SB0339, SB0828, SB0869, SB0882, SB1019 and SB1665.

Comparison of the spoligotypes obtained for the isolates cultured from independent nodes revealed differences in six animals (10.9%), each from a separate farm (Fig. 1).



Fig. 1. Genotypes corresponding to animals with compartmentalized infection. MIRU-VNTR loci differing between the strains from the same animal are highlighted in bold. M, mediastinal lymph node; T, tracheobronchial lymph node; R, retropharyngeal lymph node; MIX, pool of different lymph nodes. nt, non-typhable. Q abbreviates QUB.

other strain 113355\_35 which was coinfecting this animal, indicated also strict compartmentalization (different nodes infected by different strains).

SB0121 spoligotype is common in our context and the isolates are frequently split in several different genotypes by applying MIRU-VNTR analysis (Rodriguez-Campos et al., 2013). Here, all of the four SB0121 isolates involved in compartmentalization with MIRU-VNTR analysis available had different genotypes (Fig. 1). In order to analyze the possibility that we had overlooked compartmentalized infection in some of the animals with two SB0121 isolates, we used MIRU-VNTR to analyze 16 animals with SB0121 isolates in their different nodes. Identical MIRU-VNTR types were observed for the SB0121 isolates within each animal, thus ruling out mixed infection and compartmentalization.

### 2.3. Analysis of the isolates from the farms with compartmentalized animals

For the animal from farm three, the same two spoligotypes involved in its compartmentalized infection were detected—one each—in two animals from the same farm (Fig. 2a, animals 3a and 3b), thus supporting coinfection of animal three by two strains which were infecting independent animals. MIRU-VNTR analysis revealed an unexpected finding. Isolates SB1665 and SB0339, which were from different animals (3a and 3b),



were indistinguishable by MIRU-VNTR. However, in the coinfecting animal, the strain with the SB0339 pattern differed in two repetitions at locus QUB-3232, suggesting the emergence of a variant from a microevolution event (Fig. 2a). Extended MIRU-VNTR analysis (24 loci) for the two SB0339 variants did not reveal additional differences.

On the farm housing animal four, a further eight animals were diagnosed with bTB (Fig. 2b). Since they were all infected with a SB0121 strain, we did not detect the SB0120 strain involved in the compartmentalization of animal four. MIRU-VNTR analysis of the SB0121 strains on this farm revealed the presence of at least three different circulating strains. One of them (no. 4a, Fig. 2b), probably corresponded to the one involved in the compartmentalized infection of animal four. In this case, MIRU-VNTR analysis revealed a complex composition of circulating strains on the farm and made it possible to track the presence of one of the strains involved in the compartmentalized infection in another animal; however, the source of its other coinfecting strain was not identified.

### 3. Discussion

Molecular epidemiology studies are essential if we are to refine *M. bovis* control programs. However, the fingerprinting techniques and analytical strategies currently used for *M. bovis* are less advanced than those applied in population-based studies aimed at identifying MTB transmission chains. Highly discriminatory fingerprinting tools and refined specimen sampling recently revealed a degree of clonal complexity in infection by MTB

which is higher than that revealed by less refined genotyping strategies. Accurate identification of coinfection, superinfection, microevolution, and compartmentalized infection is essential to ensure accuracy in molecular epidemiology studies, and it also provides valuable and detailed information on relevant aspects of infection by *M. bovis*.

Until recently, studies of *M. bovis* were based on a fingerprinting tool, spoligotyping, with not too high discriminatory power and on a single isolate per infection, as was the case in molecular epidemiology of MTB some years ago. If clonal complexity also exists in infection by *M. bovis*, it has probably been overlooked using these procedures. The presence of coinfecting strains in the same culture can go undetected by spoligotyping, because it leads to overlap of coexisting strain patterns (Romero et al., 2008).

In this study, we focused on compartmentalization, which is an extreme modality of clonal complexity (Navarro et al., 2011). Compartmentalization implies not only the coexistence of  $\geq$  two strains coinfecting a single host, but also restriction of strains to specific anatomical sites and the resultant asymmetric distribution of bacteria in the host. In order to overcome the challenges implicit in this problem, we improved the sampling procedure by increasing the number of lymph nodes analyzed from each animal. Even using a low-power discriminatory tool such as spoligotyping, and in a geographical area with a low prevalence rate (0.24–0.22% in 2007–2008), we identified an unexpectedly high proportion (10.9%) of animals with mixed and compartmentalized infections. Given that our

#### a) Farm 3

ANIMAL	SPOLIGOTYPE	MIRU-VNTRtype								
		4	26	31	Q11b	ETR-B	Q26	Q11a	Q3232	ETR-A
3	SB1665	3	5	3	2	4	5	10	7	6
	SB0339	3	5	3	2	4	5	10	9	6
3a	SB1665	3	5	3	2	4	5	10	7	6
3b	SB0339	3	5	3	2	4	5	10	7	6

#### b) Farm 4

ANIMAL	SPOLIGOTYPE	MIRU-VNTRtype								
		4	26	31	Q11b	ETR-B	Q26	Q11a	Q3232	ETR-A
4	SB0120	3	5	3	3	5	5	10	8	5
	SB0121	3	5	3	2	4	5	8	-	4
4a	SB0121	3	5	3	2	4	5	8	8	4
4b	SB0121	3	5	3	2	4	5	10*	-	4
4c	SB0121	3	5	3	2	4	5	10*	-	4
4d	SB0121	3	5	3	2	4	5	10*	-	4
4e	SB0121	3	5	3	2	4	5	10*	-	4
4f	SB0121	3	5	3	2	4	5	10*	7	4
4g	SB0121	3	5	3	2	4	5	10*	6-8	4
4h	SB0121	nt								

Fig. 2. Genotypes corresponding to the two farms: (a) farm 3; (b) farm 4, including an animal with a compartmentalized infection and other infected animals (indicated by letters a–h). (a) Farm 3: 3a and 3b are additional animals. (b) Farm 4: from 4a to 4h are additional animals. MIRU-VNTR loci differing between the strains from the same animal are highlighted in bold. MIRU-VNTR loci differing between the strain from the compartmentalized animal and those from other animals sharing the same spoligotype are highlighted with an asterisk. nt: non-typable. Q abbreviates QUB.



first screening could not be performed directly with MIRU-VNTR, which has higher discriminatory power (Allix et al., 2006; McLernon et al., 2010) than spoligotyping, our findings very likely underestimate the true proportion of compartmentalization. The high sensitivity of MIRU-VNTR for detecting mixed infections (García de Viedma et al., 2005) enabled us to confirm that the compartmentalization revealed by spoligotyping was strict, with only a single strain in each infected node. To verify this finding, we performed MIRU-VNTR analysis using fluorescent primers and detected single products using capillary electrophoresis, with subsequent visual confirmation.

Very few studies report data on clonally complex *M. bovis* infections. Some of them only report mixed infections (Lamine-Khemiri et al., 2014), whereas others also found compartmentalized infections (Biffa et al., 2014; Furphy et al., 2012). In a recent study in Ethiopia (Biffa et al., 2014), nine out of 18 animals with multiple samples harbored  $\geq$  two (up to five) strains, and some of them showed a compartmentalized infection. However, the much higher prevalence rate in Ethiopia (around 50%, Firdessa et al., 2012), together with the absence of control programs, justifies these findings and highlights the relevance of our findings, which are based on a completely different epidemiological setting.

The existence of animals coinfecting by  $\geq$  two strains indicated that some of the studied farms likely had  $\geq$  two circulating strains. However, other studies also reported several circulant strains in the same farm (Costello et al., 1999; Duarte et al., 2008; Figueiredo et al., 2012; Rodríguez-Campos et al., 2013) and it did not lead to clonally complex infections.

The presence of farms with  $\geq$  two circulating strains is a finding that had been previously reported in Spain (Rodríguez-Campos et al., 2013) and it could result from contact with neighboring herds, residual infection or interaction with infected wild animals (Guta et al., 2014), since five of the six farms housing animals with compartmentalized infection has a semi-extensive management. To more accurately describe the infective context where our compartmentalized cases occurred, we genotyped additional animals from the farms housing these cases using MIRU-VNTR. However, additional animals with bTB were found in only two of the six farms where compartmentalized infection was detected. In the first farm, we confirmed the most plausible explanation, namely, that the two strains involved in the animal with compartmentalized infection had independently infected other animals on the same farm. This same case revealed an unexpected interesting finding, namely, a microevolution event leading to the emergence of a clonal variant in the compartmentalized animal that was highly similar to that infecting the other animal on the farm. Microevolution events in MTB can affect the expression of specific genes (Perez-Lago et al., 2013), subtly modify the infectivity of the variant that emerged (Navarro et al., 2013), and may even be associated with a different ability to infect extrarespiratory sites (García de Viedma et al., 2006). This equivalent finding in one of the two strains involved in compartmentalized infection by *M. bovis* suggests that these subtle changes could also play a role in infection by this pathogen.

In the second farm, however, only one of the two strains involved in the compartmentalized infection was found to be infecting other independent animals. In this case, a high variety of strains infected other animals, and, even in this context, the source for the second compartmentalized strain was not found, suggesting that the variability of infecting strains was expected to be even higher than the one depicted in the snapshot.

In summary, given the finding of 10.9% of compartmentalized infections in an area with a low prevalence of bovine TB, in certain situations it could be recommended optimizing sampling strategies by genotyping several nodes in the same animal. Such an approach would help to obtain a more accurate picture of the true composition of infecting strains in order to ensure high accuracy in molecular epidemiology studies.

Our findings are relevant for the accurate molecular tracking of *M. bovis*. Furthermore, the description of coinfection, compartmentalization, and microevolution clearly demonstrates the complexity of *M. bovis* infection and points to the need for a more in-depth analysis of the role that these events could play in infection and in the ways *M. bovis* evolves within the infective process.

### Acknowledgments

We are grateful to Thomas O'Boyle for proofreading the manuscript. The authors would like to thank to the Laboratorio de Sanidad del Principado de Asturias and the Servicio Regional de Investigación y Desarrollo Agroalimentario (SERIDA) for their continuous encouragement. This work was supported by Fondo de Investigaciones Sanitarias (FIS; ISCIII, Plan Nacional I+D+I 2008–2011 and 2013–2016) (Ref 13/01207, 12/02080) and cofinanced by FEDER funds and the Spanish Ministry of Agriculture, Food and Environment (2013/000229). Research by Yurena Navarro was supported by a PICATA predoctoral fellowship (BE55/11) from the Moncloa Campus of International Excellence (UCM-UPM, Instituto de Investigación Sanitaria Gregorio Marañón).

### References

- Allix, C., Walravens, K., Saegerman, C., Godfroid, J., Supply, P., Fauville-Dufaux, M., 2006. Evaluation of the epidemiological relevance of variable-number tandem-repeat genotyping of *Mycobacterium bovis* and comparison of the method with IS6110 restriction fragment length polymorphism analysis and spoligotyping. *J. Clin. Microbiol.* 44, 1951–1962.
- Biffa, D., Johansen, T.B., Godfroid, J., Muwonge, A., Skjerve, E., Djonje, B., 2014. Multi-locus variable-number tandem repeat analysis (MLVA) reveals heterogeneity of *Mycobacterium bovis* strains and multiple genotype infections of cattle in Ethiopia. *Infect. Genet. Evol.* 23, 13–19.
- Costello, E., O'Grady, D., Flynn, O., O'Brien, R., Rogers, M., Quigley, F., Egan, J., Griffin, J., 1999. Study of restriction fragment length polymorphism analysis and spoligotyping for epidemiological investigation of *Mycobacterium bovis* infection. *J. Clin. Microbiol.* 37, 3217–3222.
- Cunha, M.V., Matos, F., Canto, A., Albuquerque, T., Alberto, J.R., Aranha, J.M., Vieira-Pinto, M., Botelho, A., 2012. Implications and challenges of tuberculosis in wildlife ungulates in Portugal: a molecular epidemiology perspective. *Res. Vet. Sci.* 92, 225–235.
- Duarte, E.L., Domingos, M., Amado, A., Botelho, A., 2008. Spoligotype diversity of *Mycobacterium bovis* and *Mycobacterium caprae* animal isolates. *Vet. Microbiol.* 130, 415–421.
- Figueiredo, E.E., Ramos, D.F., Medeiros, L., Silvestre, F.G., Lilenbaum, W., Silva, J.T., Paschoalin, V.M., Dellagostin, O.A., 2012. Multiple strains of



- Mycobacterium bovis* revealed by molecular typing in a herd of cattle. *Vet. J.* 193, 296–298.
- Firdessa, R., Tschopp, R., Wubete, A., Sombo, M., Hailu, E., Erenso, G., Kiro, T., Yamuah, L., Vordermeier, M., Hewinson, R.G., Young, D., Gordon, S.V., Sahile, M., Aseffa, A., Berg, S., 2012. High prevalence of bovine tuberculosis in dairy cattle in central Ethiopia: implications for the dairy industry and public health. *PLoS ONE* 7, e2851.
- Furphy, C., Costello, E., Murphy, D., Corner, L.A., Gormley, E., 2012. DNA typing of *Mycobacterium bovis* isolates from badgers (*Meles meles*) culled from areas in Ireland with different levels of tuberculosis prevalence. *Vet. Med. Int.* 742478.
- García de Viedma, D., Alonso Rodríguez, N., Andres, S., Ruiz Serrano, M.J., Bouza, E., 2005. Characterization of clonal complexity in tuberculosis by mycobacterial interspersed repetitive unit-variable-number tandem repeat typing. *J. Clin. Microbiol.* 43, 5660–5664.
- García de Viedma, D., Marin, M., Andres, S., Lorenzo, G., Ruiz-Serrano, M.J., Bouza, E., 2006. Complex clonal features in an *Mycobacterium tuberculosis* infection in a two-year-old child. *Pediatr. Infect. Dis. J.* 25, 457–459.
- Guta, S., Casal, J., Napp, S., Saez, J.L., García-Saenz, A., Pérez de Val, B., Romero, B., Alvarez, J., Allepuz, A., 2014. Epidemiological investigation of bovine tuberculosis herd breakdowns in Spain 2009/2011. *PLoS ONE* 9, e104383.
- Kamerbeek, J., Schouls, L., Kolk, A., van Agterveld, M., van Soolingen, D., Kuijper, S., Bunschoten, A., Molhuizen, H., Shaw, R., Goyal, M., van Embden, J., 1997. Simultaneous detection and strain differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* for diagnosis and epidemiology. *J. Clin. Microbiol.* 35, 907–914.
- Lamine-Khemiri, H., Martínez, R., García-Jiménez, W.L., Benítez-Medina, J.M., Cortes, M., Hurtado, I., Abassi, M.S., Khazri, I., Benzarti, M., Hermoso-de-Mendoza, J., 2014. Genotypic characterization by spoligotyping and VNTR typing of *Mycobacterium bovis* and *Mycobacterium caprae* isolates from cattle of Tunisia. *Trop. Anim. Health Prod.* 46, 305–311.
- McCluskey, B., Lombard, J., Strunk, S., Nelson, D., Robbe-Austerman, S., Naugle, A., Edmondson, A., 2014. *Mycobacterium bovis* in California dairies: a case series of 2002–2013 outbreaks. *Prev. Vet. Med.* 115, 205–216.
- McLernon, J., Costello, E., Flynn, O., Madigan, G., Ryan, F., 2010. Evaluation of mycobacterial interspersed repetitive-unit-variable-number tandem-repeat analysis and spoligotyping for genotyping of *Mycobacterium bovis* isolates and a comparison with restriction fragment length polymorphism typing. *J. Clin. Microbiol.* 48, 4541–4545.
- Muwonge, A., Kankya, C., Olea-Popelka, F., Biffa, D., Ssengooba, W., Berit, D., Skjerve, E., Johansen, T.B., 2013. Molecular investigation of multiple strain infections in patients with tuberculosis in Mubende district, Uganda. *Infect. Genet. Evol.* 17, 16–22.
- Mwakapuja, R.S., Makondo, Z.E., Malakalinga, J., Moser, I., Kazwala, R.R., Tanner, M., 2013. Molecular characterization of *Mycobacterium bovis* isolates from pastoral livestock at Mikumi-Selous ecosystem in the eastern Tanzania. *Tuberculosis (Edinb)* 93, 668–674.
- Navarro, Y., Herranz, M., Pérez-Lago, L., Martínez Lirola, M., Ruiz-Serrano, M.J., Bouza, E., García de Viedma, D., 2011. Systematic survey of clonal complexity in tuberculosis at a populational level and detailed characterization of the isolates involved. *J. Clin. Microbiol.* 49, 4131–4137.
- Navarro, Y., Pérez-Lago, L., Sisilema, F., Herranz, M., de Juan, L., Bouza, E., García-de-Viedma, D., 2013. Unmasking subtle differences in the infectivity of microevolved *Mycobacterium tuberculosis* variants co-infecting the same patient. *Int. J. Med. Microbiol.* 303, 693–696.
- Navarro, Y., Herranz, M., Romero, B., Bouza, E., Domínguez, L., de Juan, L., García-de-Viedma, D., 2014. High-throughput multiplex MIRU-VNTR typing of *Mycobacterium bovis*. *Res. Vet. Sci.* 96, 422–425.
- Pérez-Lago, L., Navarro, Y., Herranz, M., Bouza, E., García-de-Viedma, D., 2013. Differences in gene expression between clonal variants of *Mycobacterium tuberculosis* emerging as a result of microevolution. *Int. J. Med. Microbiol.* 303, 674–677.
- Rodríguez-Campos, S., Navarro, Y., Romero, B., de Juan, L., Bezos, J., Mateos, A., Golby, P., Smith, N.H., Hewinson, G.R., Domínguez, L., García-de-Viedma, D., Aranaz, A., 2013. Splitting of a prevalent *Mycobacterium bovis* spoligotype by variable-number tandem-repeat typing reveals high heterogeneity in an evolving clonal group. *J. Clin. Microbiol.* 51, 3658–3665.
- Romero, B., Aranaz, A., Sandoval, A., Alvarez, J., de Juan, L., Bezos, J., Sanchez, C., Galka, M., Fernandez, P., Mateos, A., Domínguez, L., 2008. Persistence and molecular evolution of *Mycobacterium bovis* population from cattle and wildlife in Doñana National Park revealed by genotype variation. *Vet. Microbiol.* 132, 87–95.
- Smith, N.H., Upton, P., 2012. Naming spoligotype patterns for the RD9-deleted lineage of the *Mycobacterium tuberculosis* complex; [www.Mbovis.org](http://www.Mbovis.org). *Infect. Genet. Evol.* 12, 873–876.

Submitted 07/20/2015

Accepted 08/27/2015

## **Detailed chronological analysis of microevolution events in herds infected persistently by *Mycobacterium bovis***

**Yurena Navarro<sup>1,2,3,4,5</sup>, Beatriz Romero<sup>4,5</sup>, Emilio Bouza<sup>1,2,3,6</sup>, Lucas  
Domínguez<sup>4,5</sup>, Lucía de Juan<sup>4,5,7</sup>, Darío García-de-Viedma<sup>1,2,3,4\*</sup>**

1 Servicio Microbiología Clínica y Enfermedades Infecciosas, Hospital General Universitario Gregorio Marañón, Madrid, Spain

2 Instituto de Investigación Sanitaria Gregorio Marañón, Madrid, Spain

3 CIBER Enfermedades respiratorias, CIBERES

4 CEI Campus Moncloa, UCM-UPM, Madrid, Spain

5 Centro de Vigilancia Sanitaria Veterinaria (VISAVET), Universidad Complutense Madrid, Madrid, Spain

6 Departamento de Medicina, Facultad de Medicina, Universidad Complutense de Madrid, Madrid, Spain

7 Departamento de Sanidad Animal, Facultad de Veterinaria, Universidad Complutense Madrid, 28040 Madrid, Spain

\*Corresponding author: Darío García de Viedma, PhD  
Servicio de Microbiología y Enfermedades Infecciosas  
Hospital General Universitario Gregorio Marañón  
Instituto de Investigación Sanitaria Gregorio Marañón  
C/ Dr Esquerdo, 46  
28007 Madrid, Spain  
Fax: 91 5044906  
e-mail: dgviedma2@gmail.com

## **Abstract**

Various studies have analyzed microevolution events leading to the emergence of clonal variants in human infections by *Mycobacterium tuberculosis*. However, microevolution events in animal tuberculosis remain unknown. We performed a systematic analysis of microevolution events in eight herds that were chronically infected by *M. bovis* for more than 12 months. We analyzed 88 animals using a systematic screening procedure based on discriminatory MIRU-VNTR genotyping at sequential time points during the infection. Microevolution was detected in half of the herds studied. Emergence of clonal variants did not require long infection periods or a high number of infected animals in the herd. Microevolution was not restricted to strains from specific spoligotypes, and the subtle variations detected involved different MIRU loci. The genetic locations of the subtle genotypic variations recorded in the clonal variants indicated potential functional significance. This finding was consistent with the dynamics of most clonal variants, which outcompeted the original strains, suggesting an advantageous phenotype. Our data constitute a first step in defining the thresholds of variability to be tolerated in molecular epidemiology studies of *M. bovis*. We could therefore ensure that related clonal variants emerging as a result of microevolution events are not going to be misinterpreted as unrelated isolates.

**Keywords:** *Mycobacterium bovis*, microevolution, tuberculosis

Bovine tuberculosis is caused mainly by *Mycobacterium bovis* (*M. bovis*). The disease has a major impact on public health and can generate considerable financial losses. Despite the implementation of eradication strategies in recent years, bovine tuberculosis persists on some farms and can infect animals chronically over several years. Persistence of bovine tuberculosis could facilitate clonally complex infections owing to the emergence of clonal variants similar to those described for *Mycobacterium tuberculosis* (MTB) in humans (Aga et al., 2006; Al-Hajoj et al., 2010; Navarro et al., 2011; Shamputa et al., 2006).

The availability of a new highly discriminatory tool to fingerprint *M. bovis*, namely MIRU-VNTR, enabled us to reveal clonal variants coexisting in an infected animal (Biffa et al., 2014; Navarro et al., 2015). Clonal variants have also been reported in epidemiological studies (Costello et al., 1999; Firdessa et al., 2012), although they have not been characterized in detail.

In a previous study (Rodriguez-Campos et al., 2013), MIRU-VNTR analysis of farms infected by *M. bovis* strains belonging to the SB0121 spoligotype enabled us to identify five farms where clonal variants differing at a single locus between them were isolated, most likely owing to microevolution events. The limited observation time for the microevolution events in this study prevented us from drawing robust conclusions.

Therefore, in the present study, we aim to determine whether microevolution can also be detected in strains other than those belonging to the SB0121 spoligotype and to establish the chronology of the microevolution events detected. An in-depth knowledge of microevolution in infection by *M. bovis* can help us to better understand the adaptive mechanisms involved in infection by this pathogen and to establish more accurately the similarity thresholds that should be applied in molecular epidemiological studies.

## 1. Materials and Methods

### 1.1. Farms

The farms studied were selected from the 68 farms in the region of Madrid involved in bovine tuberculosis eradication programs between 2006 and 2011 and on which *M. bovis* had been isolated. Spoligotyping data were available, and were taken into consideration to ensure the variability of strains in the study sample. We selected farms where the infection was present in the herd for more than 12 months and an identical spoligotype involved during the infection had been detected. For spoligotypes other than SB0121, we selected the six herds with the longest infection regardless of the spoligotype involved. In addition, to ensure the presence of farms involving the SB0121 spoligotype, we selected the two with the longest period of positivity.

### 1.2. *M. bovis* culture and genotyping

A total of 101 tissue samples from 101 animals were decontaminated and cultured in Coletsos and Lowenstein-Jensen with pyruvate (Corner and Trajstman, 1988). Spoligotyping was performed to identify and characterize *M. bovis* isolates after boiling pelleted cultures following the protocol described by Kamerbeek (Kamerbeek et al., 1997), and profiles were assigned following a standard nomenclature (Smith and Upton, 2012). MIRU-VNTR analysis was carried out by amplifying the 24 loci included in the 24 MIRU-VNTR format (Navarro et al., 2011). In addition, QUB 11a and QUB 3232 were amplified in a duplex reaction under the same conditions.

### *1.3.MIRU-VNTR-based microevolution screening procedure*

Sequential isolates from each farm were screened to determine the occurrence of microevolution events according to the procedure described below. We analyzed the first and last isolates using multiplex MIRU-VNTR; the mobilities between the band-patterns were analyzed qualitatively in order to ascertain identity or differences (Fig. 1a). When the mobilities of the MIRU-VNTR patterns in this first screening were identical (lack of microevolution), a new round was performed for the second and penultimate isolates to compare the mobility of the triplex patterns (Fig. 1b). Sequential new rounds of screening following the same sampling scheme were performed until clonal identity was confirmed for all the isolates available separated at least 12 months or, alternatively, identification of differences in mobility (likely microevolution). In the latter case, microevolution was confirmed by simplex MIRU-VNTR analysis of the three loci involved in the triplex reaction to determine the genetic change and locus involved in the microevolution event (Fig. 1c). Once this locus was identified, we used simplex PCR to screen for differences in the remaining isolates from the farm (Fig. 1d).

#### *1.3.1. MIRU-VNTR typing*

DNA was purified from boiled isolates using a column-based purification method (QIAamp DNA Mini Kit protocol; QIAGEN, Courtaboeuf, France).

- Multiplex format: MIRU-VNTR analysis was carried out as indicated before. Amplicons were run in an agarose gel (2% MS-8; Pronadisa, Madrid, Spain) at 45V for 18.5 hours for qualitative analysis of their mobilities in order to establish differences between them in the screening of microevolution events.



- Simplex format: loci were amplified using Taq DNA Polymerase (Roche). Five microliters of DNA was added to a final volume of 50  $\mu$ l containing 1  $\mu$ l of DNA polymerase (1U), 5  $\mu$ l of PCR reaction buffer with  $MgCl_2$ , 200  $\mu$ M of each dNTP, 0.5  $\mu$ M of each primer, and different quantities of DMSO depending on the locus. One microliter of DMSO was added to the QUB 3232 mastermix, 2  $\mu$ l was added to the MIRU 4, MIRU 26, MIRU 40, and QUB 11a mastermixes, and 6  $\mu$ l was added to the MIRU 42, MIRU 43, ETR-A, QUB 11b, 1955, and QUB 26 mastermixes. One microliter of  $MgCl_2$  (final concentration 2 mM) was added for amplification of MIRU 4, MIRU 40, and QUB 11a. Cycling conditions were one cycle at 95°C for 10 min, 40 cycles at 94°C for 60s, 59°C for 60s (54°C in case of MIRU 4, MIRU 26 and MIRU 40 loci), 72°C for 110s, and 72°C of 10 min. Amplicons were sized by running electrophoresis at 45V in an agarose gel (2% MS-8; Pronadisa, Madrid, Spain) for 18.5 hours, and allelic values were assigned.

## 2. Results

Chronic infection (13-156 months) was detected on 15 of the 68 farms (22%). We selected eight for analysis. Two involved the SB0121 spoligotype (14-16 months), and six were infected with other spoligotypes (SB0265, SB0339, SB0867, and SB1142) (22-156 months).

Four farms (infection by SB0121 in two, SB0265 in one, and SB1142 in one) did not show any genetic change according to the MIRU-VNTR screening of microevolution (Fig. 2a). The emergence of a clonal variant was determined in the remaining four farms (SB0339 in two, SB0867 in one, and SB1142 in one) (Fig. 2b). Microevolution events were not associated with the duration of the infection, number of animals on the farm, or number of infected animals.

Microevolution was detected within five to 22 months (Fig. 2b); however, no microevolution was detected on some of the farms with longer infection periods (Fig. 2a). Microevolution was detected even on farms with a low number of animals (53) or infected animals (2, 8, Fig. 2b), whereas microevolution was not detected on other farms with a higher number of animals or infected animals (Fig. 2a).

A number of observations can be made with respect to the genetic changes caused by microevolution (Fig. 2b). First, only a single locus was involved in each event. Second, the number of repetitions differing between the microevolved variant and the parental strain (either gained or lost) was one, two, or three. Third, the loci involved in the microevolution events were MIRU 43, QUB 11a, QUB 3232, and MIRU 26. In order to understand the potential impact of the subtle genetic changes occurring in the microevolution events, we mapped the loci involved in the reference strain *M. bovis*

AF2122/97. QUB 11a is located intragenically, in a region coding for proteins of the PPE family. QUB 3232 and MIRU 43 are located upstream of genes that encode membrane proteins, namely, an ammonium-transport membrane protein (amt) and a conserved putative integral membrane protein (Rv0487), respectively. MIRU 26 is located upstream and within gene Rv2680 (conserved hypothetical protein).

When we analyzed the dynamics of the microevolved variant that emerged within the population, we observed different behaviors. On farm 94 (Fig. 2b), the clonal variant outcompeted the initial strain. On farm 16, the variant was only transiently detected, and on farm 52 it seemed to persist. The lack of more exhaustive sampling for the remaining farm (145) prevented us from drawing firm conclusions.

### 3. Discussion

Several studies have analyzed microevolution events leading to the emergence of clonal variants in infection by *M. tuberculosis* (Aga et al., 2006; Al-Hajoj et al., 2010; Navarro et al., 2011; Shamputa et al., 2006). However, microevolution events in animal tuberculosis remain largely unknown, and the few articles available (Costello et al., 1999; Firdessa et al., 2012) are limited to isolated descriptions of the events and provide only a snapshot of the phenomenon. In a previous study (Rodriguez-Campos et al., 2013), we described the presence of clonal variants in herds infected by prevalent SB0121 strains. However, we were unable to draw robust conclusions because the study was not expanded to other spoligotypes, our sampling strategy was limited, few MIRU loci were used in the analysis, and the observation period was short.

In this second analysis of microevolution events, we attempt to compensate for the limitations of our previous study. First, we enhanced the discriminatory power of our fingerprinting analysis by using the complete panel of 24 MIRU-VNTR loci for MTB instead of the more limited sets based on a lower number of loci that is generally applied in *M. bovis* (de la Cruz et al., 2014; Hauer et al., 2015; Malama et al., 2014; Ramos et al., 2014; Rodriguez-Campos et al., 2013; Shimizu et al., 2014). Second, we surveyed microevolution systematically, by covering sequential time points during the period of infection instead of performing a cross-sectional survey based on a single time-point (Malama et al., 2014; Ramos et al., 2014; Sanou et al., 2014). Finally, we included not only the spoligotype in which we had previously described microevolution, namely SB0121, but other, different spoligotypes in order to ascertain whether it was restricted to a specific lineage or not.

The optimized design of the present study revealed microevolution events leading to the emergence of clonal variants in half of the farms analyzed, a proportion which was completely unexpected. Nevertheless, considering that some animals with a positive tuberculin skin test did not lead to a positive culture, and therefore could not be genotyped, the true figures could therefore be even higher. Figures could also have been even higher if we had applied whole genome sequencing, which offers the highest discriminatory power (Acosta et al., 2015). However, this approach could not be adopted, because the strains involved in the study were not viable and the amount and quality of DNA required for this analysis was not available.

We detected microevolution in some of the MIRU loci known to be highly discriminative, namely, QUB 11a and QUB 3232 (Velji et al., 2009). However, microevolution was also found to involve loci with lower discriminatory power, such as MIRU 26 (Bolado-Martinez et al., 2015; Boniotti et al., 2009; McLernon et al., 2010; Rodriguez-Campos et al., 2013), and even in a locus considered to be poorly discriminative, such as MIRU 43 (Allix et al., 2006; Boniotti et al., 2009). Therefore, many microevolution events would have gone undetected if the MIRU-VNTR sets of analysis commonly used to investigate the molecular epidemiology of *M. bovis* had been applied.

The inclusion of a wide variety of spoligotypes enabled us to conclude that microevolution was not limited to specific lineages. We showed that microevolution could be found in spoligotypes other than SB0121.

It is important to define the thresholds of variability to be tolerated in *M. bovis* molecular epidemiology studies. Our data lead us to propose that these thresholds should tolerate differences of up to three repeats in a hypervariable locus or two in a stable one to ensure that related clonal variants are not going to be misinterpreted as unrelated isolates.

However, similar studies should be performed in various settings before proposing strict similarity cutoffs in molecular epidemiology studies involving *M. bovis*.

We initially expected microevolution to be time-dependent, namely, the longer the infection period, the higher the probability of detecting subtle clonal variations in the population of infecting strains. This was the reason we selected long-term, chronically infected herds. However, the analysis of farms where microevolution was detected revealed that time dependence was not as strict as expected. In some events, microevolution was detected very quickly (only five months after starting the analysis), whereas in farms with long infection times (156 months), microevolution did not occur. Similarly, we assumed that herds with a higher number of animals or infected animals would be more likely to reveal microevolution, as the stress and adaptation efforts associated with establishing new infections could facilitate selection of genotypic variations. However, no microevolution events were detected in some large herds (305 animals), and clonal variants were found on farms with much smaller herds (53 animals).

Given the lack of association between the environmental/epidemiological features that were initially assumed to facilitate microevolution and our findings, our data suggest that differences in the tendency to microevolve could depend on the *M. bovis* strains themselves and not on external environmental factors. A similar hypothesis has been proposed for *M. tuberculosis*, and specific representatives from certain lineages are considered to be more prone to acquire variability than others (Ebrahimi-Rad et al., 2003), regardless of the time of infection and the number of hosts infected.

All the clonal variants showed only subtle genotypic differences (involving only one locus) with respect to the parental strain, as expected for changes due to microevolution. Such minor changes are not expected to be functionally significant.

However, various studies on MTB found a functional impact of equivalent subtle genotypic variations on expression of neighboring genes or on the improvement in antigenic variability (Perez-Lago et al., 2011; Tantivitayakul et al., 2010; Yindeeyoungyeon et al., 2009). An equivalent scenario is possible for *M. bovis*. When we analyzed the genetic context of the variations detected in our study, some mapped at locations where a functional impact could be likely. One such variation (involving locus QUB 11a) mapped in a gene coding for a PPE protein and could modify its antigenic properties. The three other microvariations involved the loci QUB 3232, MIRU 43, and MIRU 26, which map upstream of coding genes. Therefore, subtle variations could impact on the expression of adjacent genes, as previously demonstrated for MTB (Perez-Lago et al., 2013).

In addition to this *in silico* analysis of the potential functional impact of the microevolution detected in *M. bovis*, observation of the behavior of clonal variants once they have emerged could help us to understand whether the variations acquired were advantageous or not. In three out of four events (farms 94, 52, and 145), the clonal variant outcompeted and replaced the original strain. In the remaining event (farm 16), the variant that emerged was only transiently detected, probably owing to incomplete sampling.

In summary, our systematic analysis of microevolution events in *M. bovis* infection supports the potential emergence of related clonal variants, a finding that is more common than initially assumed. Microevolution in *M. bovis* does not seem to depend on long infection periods, a high number of animals, or a high number of infected animals in the herd and is not restricted to specific strains. It could be hypothesized that the tendency to microevolve or not was more strain-dependent than environmentally mediated. The genetic locations of the subtle genotypic variations recorded in the clonal variants that emerged

indicate potential functional significance. This functional significance is consistent with the enhanced representativity of clonal variants after emergence, thus suggesting an advantageous phenotype. Our data will help to define the thresholds of variability to be tolerated in *M. bovis* molecular epidemiology studies, to ensure that related clonal variants are not going to be misinterpreted as unrelated isolates, in order to increase precision in molecular epidemiology studies involving *M. bovis*.



### **Acknowledgements**

This work was supported by Fondo de Investigaciones Sanitarias (FIS; ISCIII, Plan Nacional I+D+I 2013-2016) (Ref 13/01207, 12/02080), by the Programa de Tecnologías Avanzadas en Vigilancia Sanitaria (TAVS) from the Comunidad de Madrid (ref. S2013/ABI-2747), and cofinanced by FEDER funds. Research by Yurena Navarro was supported by a PICATA predoctoral fellowship (BE55/11) from the Moncloa Campus of International Excellence (UCM-UPM, Instituto de Investigación Sanitaria Gregorio Marañón). We are grateful to the continuous encouragement of the Área de Ganadería, Dirección General de Medio Ambiente, Consejería de Medio Ambiente, Vivienda y Ordenación del Territorio from the Comunidad de Madrid and to Thomas O'Boyle for proofreading the manuscript. We are grateful to Thomas O'Boyle for proofreading the manuscript.

None of the authors have any competing interests in the manuscript

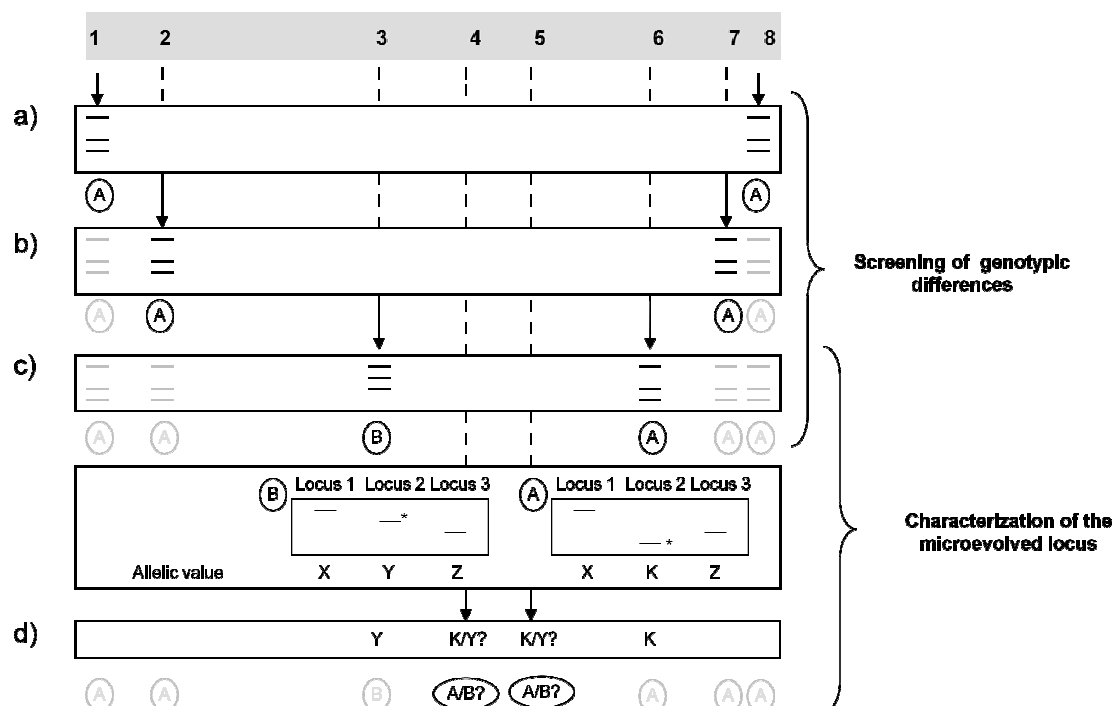
**Figure 1**

Figure 1. Screening procedure to determine microevolution events. Only one triplex PCR is shown for purposes of simplification. a) Qualitative comparison of mobilities of the three-band multiplex-MIRU-VNTR patterns, starting with the first and last isolates (identical patterns: A and A). b) Qualitative comparison of mobilities of the three-band multiplex-MIRU-VNTR patterns for the second and penultimate isolates (identical patterns: A and A). c) When differences in mobility were detected between the three-band multiplex MIRU-VNTR patterns (A and B), simplex PCR of the three loci involved (loci 1, 2 and 3 in the example, letters are arbitrary) was performed to determine the allelic values (X, Y, Z, K, letters are arbitrary) for each loci. The amplicon of the locus involved in the microevolution event (locus 2 in the example) is indicated by an asterisk. d) Once the locus involved in the microevolution event was determined in c), it was screened by simplex PCR for the remaining isolates to determine whether it harboured the Y or K allelic values

**Figure 2**

a)

Farm	Months of infection (period of time)	Animals (average)	Analyzed isolates/ total of isolates	Spoligotype
18	156 (Feb'08-Feb'11)	305	13/13	SB1142
71-72	42 (Dec'07-June'11)	90	5/9	SB0235
26	18 (Jan'06-May'07)	56	2/4	SB0121
201	14 (Sept'10-Nov'11)	123	10/17	SB0121

b)

Farm	Months of infection (period of time)	Animals (average)	Analyzed isolates	Spoligotype	MIRU-VNTRtype	Microevolved locus
16	62 (April'08-June'11)	53	12	SB0867	3522232M64313*524211334267	MIRU 43
94	46 (May'08-March'12)	178	8	SB0339	352233235421225242223343M7	QUB 11a
52	33 (June'07-March'10)	1050	36	SB0339	35223323542122524222334311M	QUB 3232
145	22 (May'08-March'11)	170	2	SB1142	3M223323421225242223343107	MIRU 26

**Figure 2.** Farms studied without (a) or with (b) microevolution. The number of months with infection, the number of animals in each farm, the number of isolates available, and the spoligotype and MIRU-VNTRtype for each strain studied are indicated. Grey bars indicate the infection period. Numbers above the bars indicate the number of available *M. bovis* isolates sampled at those time points (indicated by X in a). The figures within the grey bars indicate the allelic values of the loci involved in the microevolution event. The loci involved in microevolution in panel b are indicated as M in bold in the corresponding MIRU-VNTRtype and the allelic values are specified in the grey bars. Allelic values above 10 for certain loci are shown in a smaller font size.

## References

- Acosta, F., Chernyaeva, E., Mendoza, L., Sambrano, D., Correa, R., Rotkevich, M., Tarte, M., Hernandez, H., Velazco, B., de Escobar, C., de Waard, J.H., Goodridge, A., 2015, *Mycobacterium bovis* in Panama, 2013. *Emerg Infect Dis* 21.
- Aga, R.S., Fair, E., Abernethy, N.F., Deriemer, K., Paz, E.A., Kawamura, L.M., Small, P.M., Kato-Maeda, M., 2006, Microevolution of the direct repeat locus of *Mycobacterium tuberculosis* in a strain prevalent in San Francisco. *J Clin Microbiol* 44, 1558-1560.
- Al-Hajoj, S.A., Akkerman, O., Parwati, I., al-Gamdi, S., Rahim, Z., van Soolingen, D., van Ingen, J., Supply, P., van der Zanden, A.G., 2010, Microevolution of *Mycobacterium tuberculosis* in a tuberculosis patient. *J Clin Microbiol* 48, 3813-3816.
- Allix, C., Walravens, K., Saegerman, C., Godfroid, J., Supply, P., Fauville-Dufaux, M., 2006, Evaluation of the epidemiological relevance of variable-number tandem-repeat genotyping of *Mycobacterium bovis* and comparison of the method with IS6110 restriction fragment length polymorphism analysis and spoligotyping. *J Clin Microbiol* 44, 1951-1962.
- Biffa, D., Johansen, T.B., Godfroid, J., Muwonge, A., Skjerve, E., Djonje, B., 2014, Multi-locus variable-number tandem repeat analysis (MLVA) reveals heterogeneity of *Mycobacterium bovis* strains and multiple genotype infections of cattle in Ethiopia. *Infect Genet Evol* 23, 13-19.
- Bolado-Martinez, E., Benavides-Davila, I., Candia-Plata Mdel, C., Navarro-Navarro, M., Aviles-Acosta, M., Alvarez-Hernandez, G., 2015, Proposal of a Screening MIRU-VNTR Panel for the Preliminary Genotyping of *Mycobacterium bovis* in Mexico. *Biomed Res Int* 2015, 416479.
- Boniotti, M.B., Gorla, M., Loda, D., Garrone, A., Benedetto, A., Mondo, A., Tisato, E., Zanoni, M., Zoppi, S., Dondo, A., Tagliabue, S., Bonora, S., Zanardi, G., Pacciarini, M.L., 2009, Molecular typing of *Mycobacterium bovis* strains isolated in Italy from 2000 to 2006 and evaluation of variable-number tandem repeats for geographically optimized genotyping. *J Clin Microbiol* 47, 636-644.
- Corner, L.A., Trajstman, A.C., 1988, An evaluation of 1-hexadecylpyridinium chloride as a decontaminant in the primary isolation of *Mycobacterium bovis* from bovine lesions. *Vet Microbiol* 18, 127-134.
- Costello, E., O'Grady, D., Flynn, O., O'Brien, R., Rogers, M., Quigley, F., Egan, J., Griffin, J., 1999, Study of restriction fragment length polymorphism analysis and spoligotyping for epidemiological investigation of *Mycobacterium bovis* infection. *J Clin Microbiol* 37, 3217-3222.
- de la Cruz, M.L., Perez, A., Bezos, J., Pages, E., Casal, C., Carpintero, J., Romero, B., Dominguez, L., Barker, C.M., Diaz, R., Alvarez, J., 2014, Spatial dynamics of bovine tuberculosis in the Autonomous Community of Madrid, Spain (2010-2012). *PLoS One* 9, e115632.
- Ebrahimi-Rad, M., Bifani, P., Martin, C., Kremer, K., Samper, S., Rauzier, J., Kreiswirth, B., Blazquez, J., Jouan, M., van Soolingen, D., Gicquel, B., 2003, Mutations in putative mutator genes of *Mycobacterium tuberculosis* strains of the W-Beijing family. *Emerg Infect Dis* 9, 838-845.
- Firdessa, R., Tschopp, R., Wubete, A., Sombo, M., Hailu, E., Erenso, G., Kiros, T., Yamuah, L., Vordermeier, M., Hewinson, R.G., Young, D., Gordon, S.V., Sahile, M., Aseffa, A., Berg, S., 2012, High prevalence of bovine tuberculosis in dairy

- cattle in central ethiopia: implications for the dairy industry and public health. *PLoS One* 7, e52851.
- Hauer, A., De Cruz, K., Cochard, T., Godreuil, S., Karoui, C., Henault, S., Bulach, T., Banuls, A.L., Biet, F., Boschirolì, M.L., 2015, Genetic evolution of *Mycobacterium bovis* causing tuberculosis in livestock and wildlife in France since 1978. *PLoS One* 10, e0117103.
- Kamerbeek, J., Schouls, L., Kolk, A., van Agterveld, M., van Soolingen, D., Kuijper, S., Bunschoten, A., Molhuizen, H., Shaw, R., Goyal, M., van Embden, J., 1997, Simultaneous detection and strain differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* for diagnosis and epidemiology. *J Clin Microbiol* 35, 907-914.
- Malama, S., Johansen, T.B., Muma, J.B., Munyeme, M., Mbulo, G., Muwonge, A., Djonne, B., Godfroid, J., 2014, Characterization of *Mycobacterium bovis* from Humans and Cattle in Namwala District, Zambia. *Vet Med Int* 2014, 187842.
- McLernon, J., Costello, E., Flynn, O., Madigan, G., Ryan, F., 2010, Evaluation of mycobacterial interspersed repetitive-unit-variable-number tandem-repeat analysis and spoligotyping for genotyping of *Mycobacterium bovis* isolates and a comparison with restriction fragment length polymorphism typing. *J Clin Microbiol* 48, 4541-4545.
- Navarro, Y., Herranz, M., Perez-Lago, L., Martinez Lirola, M., Ruiz-Serrano, M.J., Bouza, E., Garcia de Viedma, D., 2011, Systematic survey of clonal complexity in tuberculosis at a populational level and detailed characterization of the isolates involved. *J Clin Microbiol* 49, 4131-4137.
- Navarro, Y., Romero, B., Copano, M.F., Bouza, E., Dominguez, L., de Juan, L., Garcia-de-Viedma, D., 2015, Multiple sampling and discriminatory fingerprinting reveals clonally complex and compartmentalized infections by *M. bovis* in cattle. *Vet Microbiol* 175, 99-104.
- Perez-Lago, L., Herranz, M., Lirola, M.M., Bouza, E., Garcia de Viedma, D., 2011, Characterization of microevolution events in *Mycobacterium tuberculosis* strains involved in recent transmission clusters. *J Clin Microbiol* 49, 3771-3776.
- Perez-Lago, L., Navarro, Y., Herranz, M., Bouza, E., Garcia-de-Viedma, D., 2013, Differences in gene expression between clonal variants of *Mycobacterium tuberculosis* emerging as a result of microevolution. *Int J Med Microbiol* 303, 674-677.
- Ramos, D.F., Silva, A.B., Fagundes, M.Q., von Groll, A., da Silva, P.E., Dellagostin, O.A., 2014, Molecular typing of *Mycobacterium bovis* isolated in the south of Brazil. *Braz J Microbiol* 45, 657-660.
- Rodriguez-Campos, S., Navarro, Y., Romero, B., de Juan, L., Bezos, J., Mateos, A., Golby, P., Smith, N.H., Hewinson, G.R., Dominguez, L., Garcia-de-Viedma, D., Aranaz, A., 2013, Splitting of a prevalent *Mycobacterium bovis* spoligotype by variable-number tandem-repeat typing reveals high heterogeneity in an evolving clonal group. *J Clin Microbiol* 51, 3658-3665.
- Sanou, A., Tarnagda, Z., Kanyala, E., Zingue, D., Nouctara, M., Ganame, Z., Combarry, A., Hien, H., Dembele, M., Kabore, A., Meda, N., Van de Perre, P., Neveu, D., Banuls, A.L., Godreuil, S., 2014, *Mycobacterium bovis* in Burkina Faso: epidemiologic and genetic links between human and cattle isolates. *PLoS Negl Trop Dis* 8, e3142.
- Shamputa, I.C., Jugheli, L., Sadradze, N., Willery, E., Portaels, F., Supply, P., Rigouts, L., 2006, Mixed infection and clonal representativeness of a single sputum sample in tuberculosis patients from a penitentiary hospital in Georgia. *Respir Res* 7, 99.
- Shimizu, E., Macias, A., Paolicchi, F., Magnano, G., Zapata, L., Fernandez, A., Canal, A., Garbaccio, S., Cataldi, A., Caimi, K., Zumarraga, M., 2014, Genotyping

- Mycobacterium bovis* from cattle in the Central Pampas of Argentina: temporal and regional trends. Mem Inst Oswaldo Cruz 109, 236-245.
- Smith, N.H., Upton, P., 2012, Naming spoligotype patterns for the RD9-deleted lineage of the *Mycobacterium tuberculosis* complex; [www.Mbovis.org](http://www.Mbovis.org). Infect Genet Evol 12, 873-876.
- Tantivitayakul, P., Panapruksachai, S., Billamas, P., Palittapongarnpim, P., 2010, Variable number of tandem repeat sequences act as regulatory elements in *Mycobacterium tuberculosis*. Tuberculosis (Edinb) 90, 311-318.
- Velji, P., Nikolayevskyy, V., Brown, T., Drobniewski, F., 2009, Discriminatory ability of hypervariable variable number tandem repeat loci in population-based analysis of *Mycobacterium tuberculosis* strains, London, UK. Emerg Infect Dis 15, 1609-1616.
- Yindeeyoungyeon, W., Likitvatanavong, S., Palittapongarnpim, P., 2009, Characterization of alpha-isopropylmalate synthases containing different copy numbers of tandem repeats in *Mycobacterium tuberculosis*. BMC Microbiol 9, 122.





## DISCUSIÓN

---



El desarrollo de las distintas herramientas de genotipado dirigidas a la caracterización de cepas de *Mycobacterium tuberculosis* (MTB) y *Mycobacterium bovis* (*M. bovis*) ha permitido optimizar la investigación de sus dinámicas de transmisión y ha conducido, por tanto, a un mejor control de la tuberculosis humana (TB) y bovina (TBb). Durante el proceso de desarrollo e implementación de estas técnicas de genotipado, se han modificado los esquemas metodológicos aplicados. De este modo, en un inicio, la técnica de RFLP-*IS6110* fue ampliamente usada como técnica de referencia para la realización de estudios poblacionales de epidemiología molecular de TB y de caracterización de brotes específicos (Edlin et al., 1992; Small et al., 1994; van Deutekom et al., 1997; van Soolingen et al., 1999). Este método fue posteriormente sustituido por la técnica de MIRU-VNTR, que aportó las ventajas de ser una técnica más rápida y sencilla y con mayor poder de discriminación que la de referencia (Joseph et al., 2013; Nabyonga et al., 2011). Por otra parte, en cuanto al estudio molecular de la transmisión por *M. bovis*, la técnica de referencia tradicionalmente aplicada fue inicialmente el espoligotipado (Aranaz et al., 1996; Gutierrez Reyes et al., 2012). Sin embargo, su insuficiente poder de discriminación, que se ha demostrado tras su aplicación en algunas poblaciones (Costello et al., 1999; Hewinson et al., 2006; Skuce et al., 2005), está propiciando el inicio de su sustitución por la técnica MIRU-VNTR, impulsado por el éxito de su aplicación en MTB (Allix et al., 2006; Marianelli et al., 2015; Sun et al., 2012).

La utilización de las técnicas de genotipado con fines de epidemiología molecular reveló una potencial aplicabilidad para la caracterización de la composición clonal de la población bacteriana que infecta a un individuo. Con anterioridad a la aplicación de estas estrategias de genotipado, se aceptaba la asunción general de que cada infección por MTB o *M. bovis*, estaba causada por una sola cepa. Sin embargo comenzaron a detectarse modalidades de infección por MTB que ponían en cuestión la citada asunción. De esta forma, el genotipado desveló que una parte de las recurrencias estaban producidas por cepas diferentes a las causantes del primer episodio (reinfecciones) (Bandera et al., 2001; Garcia de Viedma et al., 2002; Glynn et al., 2010; Jasmer et al., 2004). Asimismo, se describieron casos de pacientes coinfectados por más de una cepa (infección mixta) o con presencia de variantes clonales procedentes de una misma cepa parental (infección policlonal) (Al-Hajoj et al., 2010; Andrade et al., 2009; Shamputa et al., 2006; Shamputa et al., 2004; Warren et al., 2004). Estudios más exhaustivos han demostrado cómo algunas infecciones mixtas o policlonales pueden estar compartimentalizadas, con diferente representatividad de las cepas o variantes clonales en diferentes tejidos infectados (Andrade et al., 2009; Bernard et al., 2014; Garcia de Viedma et al., 2006). La técnica de MIRU-VNTR, responsable de un gran avance en los estudios de epidemiología molecular, ha demostrado ser un método óptimo para

identificar y caracterizar este tipo de infecciones clonalmente complejas dada su eficacia para detectar la presencia simultánea de cepas o variantes y, especialmente, su elevada sensibilidad para identificarlas cuando alguna de ellas se encuentra infrarrepresentada.

Sin embargo, si repasamos la literatura centrada en la identificación y caracterización de infecciones complejas por MTB, podemos identificar una serie de limitaciones a las que se debería dar respuesta. Así, los estudios disponibles son generalmente descripciones de casos anecdóticos (Al-Hajoj et al., 2010; Andrade et al., 2009), o analizan este fenómeno de modo restringido a determinados linajes o a situaciones especiales como es la coexistencia de cepas con diferentes fenotipos de sensibilidad de MTB (van Rie et al., 2005; Warren et al., 2004). En aquellos estudios en los que se ha abordado un estudio más sistemático de las infecciones complejas por MTB con una base poblacional se han seleccionado entornos geográficos con una alta incidencia de TB (Cohen et al., 2011; Dickman et al., 2010; Shamputa et al., 2004) que facilitan la sobreexposición (Shamputa et al., 2006) y limitan la posibilidad de hacer extensivas sus conclusiones a entornos de incidencia más moderada. En cuanto al abordaje de este problema en la TBb, los estudios se encuentran en fases mucho más preliminares que en la TB humana. La descripción de infecciones complejas es mucho más esporádica y mayoritariamente reciente (Biffa et al., 2014; Biffa et al., 2010; Lamine-Khemiri et al., 2014), como resultado del retraso que está experimentando la implementación de la técnica MIRU-VNTR, lo que obliga al desarrollo de formatos de análisis optimizados y automatizados, equivalentes a los disponibles en MTB, que permitan acelerar el estudio de estos fenómenos en *M. bovis* hasta alcanzar la situación del conocimiento obtenido en MTB.

Además de las limitaciones de la literatura antes expuestas en cuanto al estudio de las infecciones complejas, debemos añadir que los esfuerzos realizados en el estudio de estos eventos, además de escasos, han sido meramente descriptivos desde un punto de vista microbiológico. Sin embargo, sería interesante realizar un análisis de las circunstancias y consecuencias clínico-epidemiológicas que rodean al fenómeno de las infecciones complejas. Asimismo, una de las modalidades de infección compleja, la infección policlonal, nos ofrece la oportunidad de profundizar en los fenómenos implicados en la adquisición de variabilidad por este patógeno en el seno de la infección, probablemente explorando vías de adquisición de mayor eficacia infectiva mediante microevolución. Sin embargo, el tratamiento dado por la literatura al respecto es, de nuevo, meramente descriptivo, sin prestar atención al posible significado funcional que pudieran tener los cambios genómicos sutiles que aparecen en una variante clonal.

En este sentido algunos estudios apuntan a que variaciones en el número de repeticiones de MIRU-VNTR pueden conducir a un efecto funcional, bien modulando la expresión de los genes adyacentes o bien modificando la función de las proteínas afectadas (Akhtar et al., 2009; Olsen et al., 2009; Tantivitayakul et al., 2010; Yindeeyoungyeon et al., 2009). Sin embargo, carecemos de estudios que valoren diferencias funcionales entre variantes clonales identificadas en el seno de una misma infección. Asimismo, es necesario abordar de un modo integrado el estudio del significado funcional de la microevolución abarcando i) el análisis *in silico* de los cambios detectados entre las variantes clínicas reveladas mediante las distintas técnicas de genotipado, incorporando la variabilidad en SNPs identificada mediante las nuevas estrategias de secuenciación de genoma completo, ii) el estudio de los genes implicados en la microevolución mediante la realización de ensayos de expresión y finalmente iii) la evaluación final de diferencias funcionales en estudios de infectividad apoyados tanto en modelos celulares como animales que exploren el comportamiento infectivo de las variantes.

Por último, y aún en referencia a las infecciones por variantes clonales, no se presta atención al hecho de que la microevolución es un fenómeno dinámico y la mayoría de trabajos centrados en el estudio de infecciones policlonales ofrecen una visión del evento restringida a un momento de observación puntual. En este sentido, sería de gran utilidad poder monitorizar las dinámicas de microevolución y la cronología de aparición de variantes clonales en situaciones de infección crónica, para profundizar en las causas relevantes que rigen cuándo y cómo una cepa microevoluciona y las circunstancias que facilitan estos fenómenos.

El intento de abordar las limitaciones expuestas anteriormente constituye el armazón de esta tesis doctoral, que se dirige a hacer avanzar los aspectos metodológicos, analíticos y conceptuales que rodean al estudio del fenómeno de las infecciones clonalmente complejas en la infección por MTB y *M. bovis*.

## **1. Descripción de eventos de complejidad clonal en infecciones causadas por *M. tuberculosis* y *M. bovis***

Como resultado de la falta de estudios que aborden el fenómeno de las infecciones clonalmente complejas de un modo sistemático, con base poblacional y en un escenario epidemiológico que por su tasa de incidencia no favorezca la sobreexposición, decidimos abordar un estudio que compensara las limitaciones mencionadas y permitiera conocer la dimensión de infecciones complejas. Con la idea de aumentar la exhaustividad del estudio perseguimos dos aspectos: i) incluir casos tanto con TB pulmonar exclusivamente como con TB pulmonar y extrapulmonar y ii) cubrir el

espectro completo de modalidades de infecciones clonalmente complejas: coinfección con cepas diferentes y coexistencia de variantes clonales, considerando en ambos casos las opciones de encontrar ambas cepas/variantes en el pulmón o por el contrario, encontrarlas diferencialmente distribuidas (infección compartimentalizada) en tejido pulmonar y extrapulmonar.

Nuestro estudio permitió identificar todas las modalidades de infección clonalmente complejas antes mencionadas y establecer el porcentaje en el que ocurre en circunstancias no seleccionadas. Los datos indican que éstas no ocurren únicamente de modo esporádico, sino que en ocasiones alcanzan frecuencias mayores a las esperadas. Así, en cuanto a la versión de infección compleja considerada inicialmente como más extrema e infrecuente, la infección compartimentalizada, se identificó en un 14% de los casos. Estas frecuencias son inesperadamente elevadas, máxime cuando consideramos que deben de estar reflejando cifras de mínimos, dada la simplificación del muestreo realizado en nuestro estudio, un único aislado por paciente de cada tejido infectado. Diversos estudios han demostrado que a medida que incrementamos el número de aislados genotipados, es posible desvelar infecciones complejas que hubieran sido consideradas como homogéneas a partir del análisis de un único aislado (Peng et al., 2013; Shamputa et al., 2006).

Como ya se ha mencionado anteriormente, la aplicación de la técnica de MIRU-VNTR resulta clave para desvelar correctamente los casos con infecciones complejas. Así observamos cómo, en los casos con infección exclusivamente pulmonar, la aplicación de la técnica estándar RFLP-IS6110 no hubiera identificado las infecciones complejas. Las claras limitaciones de la técnica de RFLP para detectar la coexistencia de cepas/variantes en un mismo aislado ha quedado demostrada en éste y otros estudios previos, puesto que generalmente requiere de la identificación de bandas de hibridación de baja intensidad, difíciles de diferenciar de bandas residuales de hibridación, lo que implica un elevado grado de experiencia para su correcta interpretación y conlleva una elevada inespecificidad en cuanto a la asignación (Allix et al., 2004; Cohen et al., 2012; Huyen et al., 2012). Además, en cuanto a los casos con infección tanto pulmonar como extrapulmonar, la menor discriminación de la técnica RFLP hubiera perdido parte de los casos complejos desvelados por la técnica MIRU-VNTR.

Puesto que la filosofía de esta tesis era la de abordar en lo posible el estudio de las infecciones clonalmente complejas tanto en MTB como en *M. bovis*, el siguiente paso era el de intentar comenzar a obtener información al respecto de la complejidad clonal en la TBb. De este modo realizamos un primer estudio, no tan ambicioso como el abordado en MTB, pero que comparte las exigencias de sistemático y poblacional, aunque ahora

centrado en rastrear únicamente una modalidad de infección clonalmente compleja, la más extrema, la infección compartimentalizada, en un entorno epidemiológico, Asturias, de baja incidencia de TBb. El genotipado sistemático mediante espoligotipado, de varios linfonodos de cada animal, arrojó cifras de infección compartimentalizada inesperadamente elevadas (11%), equivalentes al obtenido en el análisis equivalente en TB humana. Los pocos estudios que exploran este fenómeno se han realizado en entornos epidemiológicos de alta incidencia de TBb como Etiopía, donde alcanzan cifras de hasta el 50% de los casos (Biffa et al., 2014; Furphy et al., 2012). Sin embargo, esta alta incidencia así como la falta de estrategias de control pueden justificar esos porcentajes.

Sin embargo, al igual que la técnica de RFLP-IS6110, el espoligotipado es un método muy deficiente para la identificación de coexistencia de cepas/variantes (Huyen et al., 2012). Los datos derivados del estudio en la TB humana indicaban que la aplicación de MIRU-VNTR era esencial para garantizar una identificación eficaz de infecciones complejas. Esta observación obligaba a contar asimismo con una metodología equivalente para análisis en *M. bovis*. Sin embargo, la experiencia acumulada en *M. bovis* con respecto a la técnica MIRU-VNTR era marcadamente menor que en MTB, y no se disponía de un formato consensuado de análisis que facilitara la identificación de infecciones complejas (Ameni et al., 2010; Biffa et al., 2010; Gutierrez Reyes et al., 2012; Milian-Suazo et al., 2008; Rodriguez-Campos et al., 2013). En este sentido, siendo conscientes de la falta de una metodología adecuada, nuestro objetivo fue optimizar y adaptar un formato de análisis idóneo para *M. bovis*, que aunara una elevada sensibilidad de detección con un análisis estandarizado. En este sentido adaptamos la estrategia que había sido desarrollada para MTB, basada en análisis MIRU-VNTR multiplexado con separación de fragmentos en electroforesis capilar y asignación automática de alelos (Supply et al., 2006). Este diseño resulta óptimo para detectar tanto infecciones mixtas como para detectar cepas/variantes infra-representadas (García de Viedma et al., 2005a). El esquema de multiplexado permite una mayor automatización de la técnica, reduciendo así los posibles errores que pueden producirse en asignaciones o transcripciones de valores alélicos. Además, este formato simplifica la realización de la técnica y reduce los tiempos de obtención del MIRUtipo.

Volviendo al estudio de compartimentalización en TBb, quisimos aplicar el nuevo formato de MIRU-VNTR multiplexado para refinar el estudio. De este modo, la alta sensibilidad de MIRU-VNTR para identificar variantes minoritarias permitió asegurar que la compartimentalización propuesta por el análisis de espoligotipado era estricta, con la presencia de una única cepa diferente en cada tejido. Además, la superioridad del nuevo formato de MIRU-VNTR multiplex para la identificación de infecciones complejas



quedo evidenciada tras el estudio de uno de los casos, en el cual se disponía de un cultivo de un pool de tejidos, y en el que se reveló una infección mixta que había pasado desapercibida para el espoligotipado.

Finalmente, considerando la alta probabilidad de que MIRU-VNTR se convierta en el método de referencia para el genotipado de *M. bovis* con fines de epidemiología molecular, el formato de análisis MIRU-VNTR multiplexado puesto a punto en esta tesis, facilitaría la transición a un formato de alto rendimiento capaz de dar respuesta a los interrogantes del trabajo de campo. La flexibilidad del formato permite adaptarlo a diferentes escenarios epidemiológicos, seleccionando la combinación de loci más idóneos y discriminativos en función de la composición de cepas circulantes en cada entorno. De esta forma, en nuestro contexto, debido a la existencia de un espoligotipo prevalente (Rodríguez et al., 2010), sería posible adaptar el formato a una estrategia de análisis en dos etapas, la primera basada en la aplicación de una única PCR triplex que engloba 3 de los 4 loci más discriminativos para dicho espoligotipo (Rodríguez-Campos et al., 2013), y una segunda etapa extendida a loci adicionales que únicamente sería aplicada en casos que requirieran de una mayor capacidad de discriminación.

## **2. Factores relacionados con la aparición de infecciones clonalmente complejas**

Una vez analizada la dimensión que pueden alcanzar las infecciones complejas desde un punto de vista clonal, tanto por MTB como por *M. bovis*, y definidas las estrategias metodológicas más idóneas para asegurar su detección, parecía oportuno reflexionar acerca de los posibles factores que pudieran favorecer su aparición. De este modo se podría intentar identificar las circunstancias clínico-epidemiológicas en las que sea más probable encontrar este tipo de infecciones.

Dada la diferente naturaleza de las dos modalidades de infecciones complejas manejadas en esta tesis era necesario proceder al análisis de los factores favorecedores de modo independiente ya que las circunstancias que debieran conducir a la existencia de infecciones mixtas por cepas diferentes probablemente difieran de las que se asocian a la aparición de infecciones policlonales, con la participación de variantes clonales.

### **2.1. Factores relacionados con la aparición de infecciones mixtas.**

A la hora de analizar las posibles situaciones clínico-epidemiológicas que pueden conducir a la aparición de un caso de TB con infección mixta podríamos considerar diferentes escenarios, entre ellos: la coinfección simultánea a partir de un caso que presentara, asimismo infección mixta (Braden et al., 2001); la sobreinfección con una

cepa diferente a la implicada en el episodio del caso (Chaves et al., 1999; Mankiewicz y Liivak, 1975); y la reactivación de una infección latente como consecuencia de una infección reciente con una cepa diferente. La dificultad inherente a la trazabilidad de las rutas de transmisión en TB hace complicado poder identificar con precisión cuál de las explicaciones anteriores está detrás de cada caso identificado con infección mixta, especialmente en un entorno de moderada incidencia como el que nos ocupa. En nuestros estudios, hemos intentado apoyarnos en la información clínica y epidemiológica de los pacientes, así como en los datos de epidemiología molecular poblacional disponibles en nuestro grupo para intentar aproximarnos a las explicaciones más probables para los casos identificados.

Atendiendo a la información epidemiológica, la identificación de circunstancias en las que la exposición a más de un caso infeccioso sea posible, permitiría etiquetar a los casos cuya infección mixta haya podido ser causada por coinfección o sobreinfección. En nuestro estudio, casi la mitad de los casos estudiados, correspondían a pacientes bien sin hogar, o bien que habitaban en viviendas compartidas, generalmente en condiciones precarias, lo que facilitaría la exposición a casos infecciosos. Esta hipótesis pudo reforzarse, en algunos de los casos, gracias a los datos de epidemiología molecular, puesto que las cepas implicadas en esas infecciones mixtas formaban parte de cadenas de transmisión (*clusters*) activas en su población, lo que es indicador de que las cepas estaban circulando activamente en su entorno.

Por otro lado, la explicación alternativa de que la infección mixta pueda ser resultado de una reactivación coincidente con una infección reciente, requiere para su consideración la documentación de la existencia de un episodio de TB previo en el paciente. Esta situación pudo encontrarse en un único caso, que correspondió a un paciente de origen ghanés coinfectado con *M. tuberculosis* y *M. caprae*. El hecho de que las infecciones con *M. caprae* sean extremadamente infrecuentes en España (Rodríguez et al., 2009), abre la posibilidad a que la infección por esta especie del complejo MTB haya sido adquirida en el país de origen del caso y hace plausible que el episodio actual corresponda con una reactivación coincidente con una infección reciente por MTB. La hipótesis de reactivación coincidente con infección reciente por otra cepa puede intentar soportarse en los datos de epidemiología molecular. En este caso esperaríamos que una de las cepas implicadas en la infección mixta fuera identificada en algún *cluster* de esa población, lo que indicaría circulación activa, mientras que la otra cepa resultara huérfana, indicador de que esta cepa no circula ya en ese entorno poblacional y por tanto puede corresponder a una reactivación de una

infección acontecida en el pasado. Estos condicionantes fueron cumplidos por tres de los casos con infección mixta.

De los dos escenarios manejados como posibles facilitadores de infección mixta, este último, el de la reactivación de una TB pasada coincidente con una infección reciente por una cepa diferente, puede parecer el más inverosímil. Con el fin de comprobar si era posible localizar algún caso que reflejara con una elevada probabilidad esta causa de infección mixta dedicamos esfuerzos a rastrear la presencia de este paciente modelo en nuestro entorno. Como resultado, identificamos un paciente candidato, representante de una infección mixta por dos cepas de MTB, que además, mostraban diferente sensibilidad antibiótica, siendo una cepa multirresistente y la otra pansensible. Tras aglutinar las observaciones de los ensayos diagnósticos moleculares y fenotípicos, con los datos clínicos y epidemiológicos del paciente, así como con los datos de epidemiología molecular de las cepas implicadas en la infección mixta, fue posible sustentar una explicación para este caso. Los datos reforzaban que la causa de esta infección mixta era la coincidencia de i) una reactivación de una cepa MDR que había sido adquirida 3 años antes como resultado de un contacto domiciliario prolongado con un caso con TB por esa misma cepa MDR, y de ii) la infección reciente por una cepa sensible que se encontraba activamente circulando en el entorno epidemiológico del caso. La existencia de un caso modelo de estas características en un escenario epidemiológico de moderada incidencia de TB y con baja prevalencia de resistencias sugiere que es posible encontrar circunstancias que conduzcan a infecciones mixtas derivadas de causas complejas más allá de los entornos de elevada prevalencia donde generalmente se asume que están restringidas.

En relación al estudio paralelo de infecciones complejas por *M. bovis*, por dificultades inherentes a la limitación de la información que es posible obtener de los eventos de TBb nos focalizamos a intentar documentar como causa posible de las infecciones mixtas identificadas, la sobreinfección por dos cepas que se encuentren circulando de manera independiente en la población, en este caso la explotación. La demostración de esta hipótesis requiere disponer de muestreos exhaustivos del resto de animales enfermos en las explotaciones en las que se identifique un animal con infección mixta. Lamentablemente, en nuestro estudio no existían esos aislados adicionales mas que en un número reducido de explotaciones, con lo que esta hipótesis pudo ser confirmada en un único caso. En el resto de las explotaciones en las que se detectó un animal con infección mixta, bien no se identificaron las cepas implicadas en otros animales enfermos o bien no constaban animales adicionales infectados. Sin embargo, hay que tener en cuenta que la dinámica de exposición y transmisión en la TBb se puede

extender más allá de la propia explotación, debiéndose contemplar la posibilidad de contacto con animales salvajes o interacción en pastos contaminados, que pudieran constituir eslabones de transmisión entre explotaciones cercanas (de la Cruz et al., 2014).

## 2.2. Factores relacionados con la aparición de infecciones policlonales

A la hora de analizar las circunstancias clínico-epidemiológicas asociadas a la aparición de infecciones policlonales, el planteamiento debe ser diferente al expuesto con anterioridad para la otra modalidad de infecciones complejas, las infecciones mixtas. Es importante recordar que en el caso de las infecciones policlonales nos encontramos ante la coexistencia de variantes clonales relacionadas filogenéticamente. Esta relación se debe a que, a partir de una cepa parental, mediante fenómenos de microevolución se generan cambios genómicos sutiles que dan lugar a la/s variante/s clonal/es (Casali et al., 2012; de Boer et al., 2000; Kato-Maeda et al., 2013).

Por tanto, a la hora de definir las circunstancias que pudieran favorecer las infecciones policlonales, resulta obvio que deben ser aquellas que ofrezcan una ventana temporal suficientemente amplia para que la cepa pueda experimentar esos eventos de microevolución (Colangeli et al., 2014; Eldholm et al., 2014; Merker et al., 2013). Este intervalo temporal podría conseguirse en circunstancias de demora diagnóstica prolongada, si estamos considerando una infección activa (Al-Hajj et al., 2010). Asimismo, podríamos considerar que durante un período de latencia podría ofrecerse esa ventana temporal necesaria para que acontezcan los fenómenos de microevolución si interpretamos el período de latencia como un período con cierto nivel de división del bacilo (Colangeli et al., 2014).

Tras analizar los datos clínicos y epidemiológicos de los pacientes con infecciones policlonales, sólo algunos de los casos en los que se disponía información de demora diagnóstica, mostraron un período suficientemente extenso como para permitir la generación de las variantes clonales. En cuanto a la existencia de un episodio de TB previa que pudiera haber aportado un período de latencia previa a la detección de la infección policlonal, sólo se pudo documentar en tres casos. Por tanto, aunque había una parte de pacientes en los que las infecciones clonales pudieran acogerse a los perfiles hipotéticos comentados, parecía claro que podían encontrarse infecciones policlonales fuera de los escenarios planteados. Esto nos llevó a considerar una nueva opción, la posibilidad de que los casos en los que se había identificado infección policlonal hayan sido meros receptores de la complejidad clonal generada en el caso que les infectó, bien a su vez por demora diagnóstica o bien por variabilidad generada durante una fase de latencia en ese caso índice. Intentamos buscar apoyo para esta hipótesis alternativa

mediante el rastreo de las cepas implicadas en las infecciones policlonales en otros miembros de la población apoyados en los estudios disponibles de epidemiología molecular poblacional. Sin embargo no se identificaron estas cepas en otros casos de la población.

El hecho de que se observaran infecciones policlonales sin que fuera posible identificar alguna circunstancia clínica-epidemiológica que lo justificara nos hizo profundizar en los aspectos que pudieran regular la emergencia de variantes clonales. Éramos conscientes de que el estudio de un fenómeno dinámico como la microevolución no debía abordarse con estudios en los que únicamente observábamos un instante del proceso infeccioso de cada paciente. La comprensión más detallada de los eventos de microevolución que conducen a las infecciones policlonales requiere de una aproximación diferente, idealmente a través de modelos de infección prolongada o crónica. Por causas obvias no es posible contar con este tipo de modelos en TB humana, sin embargo, recordemos de nuevo nuestro interés de abordar en paralelo el estudio de estos fenómenos en TBb. En este sentido, la existencia de explotaciones de animales crónicamente infectados con *M. bovis* nos brindó una excelente oportunidad para estudiar cronológicamente los fenómenos de microevolución así como los posibles factores que influyen en su generación, debido a un muestreo continuo exhaustivo de animales infectados. Con este fin se monitorizaron diferentes cepas de *M. bovis* responsables de infecciones crónicas en explotaciones independientes. De nuevo observamos que la aparición de variantes clonales no estaba exclusivamente asociada a las circunstancias con las que, intuitivamente, debían estar relacionadas (duración de la infección persistente en la explotación o número de animales infectados).

Como resultado de la constatación de que era posible detectar infecciones policlonales tanto en MTB como en *M. bovis* independientemente de que se cumplan los factores clínicos y epidemiológicos esperados, pasamos a evaluar la posible participación adicional de factores propios de la cepa en estos eventos. Nuestro nuevo planteamiento conducía a considerar, como hipótesis complementaria, el que diferentes cepas pudieran mostrar diferente tendencia a microevolucionar y por tanto que las infecciones policlonales pudieran estar asociadas a la infección por determinadas cepas.

En esta nueva línea de trabajo, resultaría de utilidad la identificación de cepas que mostraran un comportamiento en microevolución opuesto al esperado por los factores del entorno. En otras palabras, cepas que no microevolucionaran a pesar de tener oportunidades y, por el contrario, cepas con una tendencia a microevolucionar aún en situaciones inesperadas. Afortunadamente pudimos identificar una cepa modelo de cada uno de estos comportamientos, lo que apoyaba la participación adicional de

factores puramente bacterianos en los eventos de microevolución que pueden conducir a la aparición de infecciones policlonales.

La existencia de cepas sin capacidad de microevolucionar a pesar de tener oportunidades quedó ejemplificada gracias al estudio en profundidad de un caso infectado persistentemente durante 8 años con una misma cepa. Este paciente reunía las condiciones idóneas para la generación de variantes clonales ya que, durante los 8 años, no realizó una adecuada adherencia al tratamiento. Esto ofrecía una enorme ventana temporal a la cepa para microevolucionar, mucho más prolongada que las demoras diagnósticas que habíamos considerado con anterioridad. Sin embargo, tras el análisis de los distintos aislados mediante técnicas de genotipado convencional, e incluso mediante secuenciación de genoma completo, no se observó ningún tipo de modificación genómica, ni siquiera SNPs.

Por otro lado, el estudio exhaustivo de otro caso de infección por MTB, nos facilitó la cepa modelo de alta tendencia de microevolución en situaciones que no lo propiciaban. La cepa correspondió a un paciente con microevolución en el seno de una recurrencia. La variabilidad adquirida afectaba a diferentes marcadores y era detectada por diferentes técnicas de genotipado (RFLP-*IS6110* y MIRU-VNTR). Asimismo, se identificaron 11 SNPs diferenciales entre ambas variantes que correspondían a dos variantes independientes de dos rutas evolutivas diferentes a partir de una cepa parental. Una nueva variante clonal adicional a las dos identificadas en muestras clínicas surgió en el seno de un ensayo de infección en macrófagos, tras sólo 7 días del inicio de la infección.

Por tanto, la identificación de dos cepas con tendencias tan marcadamente diferenciales en cuanto a la capacidad de microevolucionar apoya la existencia de factores bacterianos implicados en la aparición de infecciones policlonales, que complementan a los clínico-epidemiológicos. Otros autores han propuesto asimismo que algunas cepas muestran una tendencia incrementada a adquirir variabilidad, lo que entra en sintonía con nuestra propuesta (Ebrahimi-Rad et al., 2003).

### **3. Estudio del impacto funcional de los cambios genómicos generados durante la microevolución**

El carácter estable de *Mycobacterium tuberculosis*, desde un punto de vista de variabilidad genética, condicionado por su baja tasa de división, ausencia de plásmidos y reducida recombinación (Gutacker et al., 2002; McEvoy et al., 2007), induce a considerar que cualquier cambio genotípico debiera conllevar algún tipo de ventaja

adaptativa. El hecho de que podamos detectar un cambio genotípico sutil significa que éste ha sido fijado desde una representación poblacional minoritaria en la que surge por azar. Por tanto, esta fijación debiera de aportar algún tipo de ventaja a la variante que lo adquiere y por tanto tendemos a asumir que el citado cambio debe de tener un significado funcional. Algunas de las observaciones derivadas del estudio cronológico de microevolución en *M. bovis* asimismo sugieren que los cambios genómicos adquiridos parecen conferirle a la bacteria algún tipo de ventaja puesto que pudimos observar cómo las variantes que emergen en el seno de las infecciones crónicas son capaces de reemplazar a la cepa parental. Estos aspectos justifican que el fin último del estudio de microevolución sea el de intentar profundizar en su significado funcional.

El primer abordaje conllevó una primera aproximación *in silico* del posible papel funcional que potencialmente pudieran conllevar los cambios genómicos identificados. Desde el punto de vista de la variabilidad generada por las modificaciones detectadas en las secuencias de inserción IS6110, observamos cómo éstas se encontraban en genes que codificaban para diferentes enzimas y proteínas, lo que conlleva una evidente implicación en la modificación o incluso eliminación de la función de estas proteínas. En cuanto a la variabilidad generada por modificaciones en el número de repeticiones de determinados loci MIRU-VNTR, observamos que los loci implicados se localizaban bien intragénicos, con lo que de nuevo era factible asumir un impacto funcional, o bien intergénicos dejando abierta la posibilidad de un efecto sobre la expresión de genes adyacentes. La reciente introducción de la secuenciación de genoma completo en la caracterización de MTB nos ha permitido extender el conocimiento de los cambios que pueden acontecer por fenómenos de microevolución, incorporando la variabilidad en forma de SNPs entre variantes clonales (Jamieson et al., 2014; Mehaffy et al., 2014). En nuestro estudio, la mayoría de estos polimorfismos eran no sinónimos y mapeaban en genes, algunos de ellos esenciales, que codifican para distintas enzimas y proteínas de membrana. Por lo tanto, estos SNPs podrían suponer cambios conformacionales de la pared celular potencialmente asociados a escapes del control inmunitario, o bien, modificaciones en el metabolismo bacteriano, que pudieran conducir a ventajas adaptativas en alguno de los estadios por los que transcurre la infección por MTB.

Puesto que el análisis *in silico* dejaba abierta la posibilidad al impacto funcional de los diferentes cambios genotípicos recogidos tras nuestros estudios de eventos de microevolución, tenía sentido progresar en el análisis, ya de un modo experimental. De modo que recurrimos a evaluar los posibles cambios en la expresión de ciertos genes que había sugerido el análisis *in silico*. Los trabajos previos que habían estudiado el efecto funcional de las modificaciones en el número de repeticiones de ciertos loci MIRU-VNTR



adolescían de deficiencias de diseño, puesto que evaluaban el efecto en expresión tras clonar la región de interés, desvirtuando el contexto genómico original (Akhtar et al., 2009; Tantivitayakul et al., 2010; Yindeeyoungyeon et al., 2009). Por lo tanto, era necesario realizar un estudio comparativo entre variantes isogénicas, que únicamente mostraran diferencias en el loci MIRU-VNTR en análisis, para poder evaluar con rigor si variaciones en el número de repeticiones podían tener un impacto en expresión génica. En nuestro estudio cumplimos con este requisito y, gracias a ello, podemos afirmar que los cambios sutiles en MIRU-VNTRs adquiridos por fenómenos de microevolución son capaces de modificar la expresión de los genes contiguos.

Con respecto al impacto funcional esperado como resultado de la variabilidad de SNPs adquirida, se identificó un cambio especialmente atractivo que correspondía a una sustitución no sinónima en el represor transcripcional *mce3R*, modulador del regulón *mce3*. Éste está constituido por genes implicados en virulencia, metabolismo de lípidos y reacciones redox (de la Paz Santangelo et al., 2009). Ensayos de expresión *in vitro* demostraron que la presencia del SNP en estudio conllevaba un efecto en la expresión del primer gen del operón, lo que significa un potencial efecto funcional.

El estadio final en el proceso de evaluación del significado funcional de los cambios adquiridos por microevolución supone la constatación de que alguna de estas modificaciones altera la capacidad infectiva de las variantes. Puesto que los cambios genotípicos son enormemente sutiles, sospechamos que de detectarse un impacto sobre infectividad, éste debería ser inevitablemente tenue. En este sentido era posible que estos cambios menores no fueran desvelados por un modelo de infección convencional y que los resultados dependieran de las condiciones de infección seleccionadas, tal y como se había publicado recientemente a la hora de valorar la infectividad de diferentes cepas de MTB resistentes (Yokobori et al., 2013). De modo que se dedicaron esfuerzos para poner a punto diferentes versiones del modelo de infección en macrófagos estandarizado para MTB con el fin de aumentar las oportunidades de identificar diferencias en infectividad que pudieran pasar desapercibidas con un modelo de infección celular convencional. Tras la aplicación de cuatro estrategias infectivas diferentes con una selección de variantes clonales obtenidas de pacientes que habían mostrado un notable grado de microevolución se consiguió documentar diferencias en su infectividad. Estas diferencias se revelaron especialmente en condiciones de coinfección competitiva, quizás poniendo de manifiesto la necesidad de recrear situaciones experimentales similares al entorno clínico, en el que las diversas variantes clonales coexisten en el mismo proceso infeccioso.

Finalmente quisimos evaluar si, del mismo modo que era posible identificar diferencias en infectividad en modelos celulares entre las variantes surgidas por microevolución, podíamos documentar un efecto equivalente sobre un modelo complejo de infección, el modelo murino. De modo equivalente a las observaciones recogidas en el modelo celular, únicamente tras realizar ensayos de coinfección con dos variantes pudimos desvelar una mayor capacidad infectiva de una de las mismas.

#### **4. Implicaciones epidemiológicas y clínicas de la complejidad clonal**

Los estudios incluidos en esta tesis han permitido profundizar en la detección, caracterización y análisis del significado funcional de las infecciones complejas, desde un punto de vista clonal, por MTB y *M. bovis*. Es oportuno ahora revisar los contextos en los que la consideración de la existencia de este tipo de infecciones puede tener un impacto.

El primer entorno de trabajo en el que debemos de contemplar la existencia de infecciones complejas es el de la epidemiología molecular. Las cadenas de transmisión de TB se identifican tras constatar la existencia de un grupo de pacientes infectados por una misma cepa (*cluster*) (Gurjav et al., 2014; van Soolingen et al., 1999). La identificación de estos *clusters* permite conocer la/s cepa/s que se encuentra/n activamente circulando en una población y hacia las que debemos dirigir nuestros recursos de control para evitar su transmisión. Generalmente, para la definición de un *cluster* se exige identidad entre los patrones genotípicos de los diferentes aislados. Es fundamental garantizar una correcta definición de todos los casos en *cluster* para asegurar que todos los miembros de una cadena de transmisión han sido identificados y por tanto conocer con precisión la magnitud del evento así como el entorno y los factores de riesgo asociados a la transmisión. Las diferentes modalidades de infecciones complejas manejadas en esta tesis, infecciones mixtas, infecciones policlonales, infecciones compartimentalizadas, de no considerarse en el proceso de genotipado y asignación de *clusters*, van a conducir a imprecisiones en la asignación de genotipos, que conducirán a la no inclusión de casos en su correspondiente *cluster*. Ello repercutirá en una inespecificidad en los estudios de epidemiología molecular, que excluirán equivocadamente a ciertos casos de sus *clusters*, por no haberse analizado bajo la consideración de la coexistencia de varias cepas o variantes. A nivel poblacional, es relevante incorporar todas estas consideraciones en los análisis de epidemiología molecular si pretendemos lograr un correcto control epidemiológico y finalmente minimizar la transmisión de la tuberculosis. Todos estos aspectos, relevantes para el control de la transmisión de MTB, por supuesto son trasladables a los estudios de epidemiología molecular de *M. bovis*. La no consideración de infecciones complejas en explotaciones

infectadas por *M. bovis* puede llevar a errores en la asignación de genotipos, equivalentes a los mencionados para MTB. De este modo, explotaciones con infecciones crónicas que implican animales con infecciones mixtas o eventos de microevolución pueden ser erróneamente consideradas infecciones con cepas que presentan genotipos diferentes. Este error conducirá a un manejo equivocado del problema, al interpretarse la existencia de importaciones de nuevas cepas en la explotación causadas por la entrada de nuevos animales, en vez de manejar adecuadamente el problema como una única infección persistente/crónica.

Ya en un entorno de análisis no poblacional sino del manejo individual de cada paciente, también es necesario contemplar la posibilidad de encontrarnos ante una infección compleja. Obviamente, estas infecciones van a tener un especial impacto cuando implican a cepas/variantes clonales con distinto patrón de sensibilidad antibiótica. Se ha descrito cómo la presencia de cepas de este tipo en un mismo episodio, cuando pasan desapercibidas, pueden conducir a regímenes terapéuticos inapropiados (Peng et al., 2013; Shamputa et al., 2004; van Rie et al., 2005). La consideración inicial de que estas situaciones están restringidas a entornos de alta incidencia de TB y elevadas tasas de resistencia es puesta en cuestión en esta tesis por el hallazgo de un caso de este tipo en un entorno de moderada incidencia de TB y tasas de resistencia reducidas. Únicamente gracias a la interpretación de este caso desde el prisma de la complejidad clonal e integrando datos clínicos, epidemiológicos y moleculares fuimos capaces de desvelar la coinfección simultánea con una cepa sensible y otra MDR, marcadamente infrarrepresentada. Un fallo en la detección precoz de pacientes coinfectados simultáneamente con dos cepas con distinto perfil de sensibilidad antibiótica conlleva evidentes repercusiones terapéuticas (van Rie et al., 2005). Las más obvias, la instauración de tratamientos de primera línea ineficaces. Las más complejas, las derivadas del diferente *fitness* esperado para cepas MDR y sensibles que conducirá a reemergencias priorizadas de la cepa sensible en casos de mala adherencia al tratamiento, lo que conducirá a reinterpretaciones erróneas del perfil de sensibilidad del caso. Por otro lado, pacientes coinfectados con cepas MDR/S en los que se identifique correctamente la cepa resistente y en los que se instaure tratamiento correcto de segunda línea, pueden eliminar con menos eficacia a la cepa sensible debido al menor poder bactericida de estos fármacos comparados con los de primera línea, dejando abierta la posibilidad de recurrencias. Finalmente, la confusión generada de la interpretación de discrepancias obtenidas de los ensayos de sensibilidad en los casos con infecciones complejas de este tipo no sospechadas, generan inevitablemente retrasos en la elección del tratamiento adecuado, lo que puede ampliar la ventana de oportunidad de transmisión y afectar al pronóstico.

Por último, al margen ya del impacto terapéutico, las diferentes cepas/variantes implicadas en infecciones complejas pueden mostrar diferencias en infectividad, virulencia y capacidad de infectar tejidos extrapulmonares. Este último aspecto queda ilustrado por las infecciones compartimentalizadas, en las que la distribución diferencial de cepas/variantes en diferentes tejidos indica una diferente capacidad de infección de los mismos. Así, se ha descrito que las cepas implicadas en infecciones compartimentalizadas que son capaces de infectar tejidos extrapulmonares, presentan una mayor virulencia, *in vitro* e *in vivo* que aquellas que quedan restringidas al tejido pulmonar (García de Viedma et al., 2005b). En este mismo sentido, algunos de los estudios incluidos en esta tesis demuestran cómo el rastreo de infecciones policlonales nos ha permitido identificar variantes clonales con una infectividad optimizada con respecto a la cepa parental de la que han microevolucionado. Por tanto los casos con infecciones complejas pueden constituir un modelo clínico de identificación de cepas con mayor capacidad infectiva, que podrían facilitar la identificación de nuevos factores de virulencia o mecanismos de infectividad.

## CONCLUSIONES

---



## **CONCLUSIONES**

1. El rastreo sistemático de infecciones complejas por *Mycobacterium tuberculosis* en pacientes con tuberculosis pulmonar ha permitido conocer su magnitud en una población de moderada incidencia, identificándose una proporción equivalente de infecciones mixtas (1%) y policlonales (1,4%).
2. Los eventos de complejidad clonal ocurrieron más frecuentemente (14%) en los casos de tuberculosis con afectación tanto pulmonar como extrapulmonar y la mayoría de los mismos mostraron una infección compartimentalizada.
3. La no consideración de la complejidad clonal en tuberculosis puede conducir a dificultades diagnósticas y terapéuticas en el manejo de estos casos.
4. La descripción de un caso con una infección reciente por *Mycobacterium tuberculosis* coincidente con la reactivación de una infección por una cepa diferente indica que las infecciones mixtas no están exclusivamente asociadas a coinfección o sobreinfección.
5. La técnica de MIRU-VNTR multiplex resulta idónea para abordar el rastreo optimizado de complejidad clonal en la infección por *Mycobacterium bovis*.
6. El fenómeno de microevolución se observó en una frecuencia superior en las infecciones animales por *Mycobacterium bovis* que en las infecciones por *Mycobacterium tuberculosis* en humanos, siendo equivalente la frecuencia de infecciones compartimentalizadas.
7. La magnitud de la microevolución observada en *Mycobacterium bovis* permite definir los umbrales de variabilidad que pueden ser tolerados en el marcador MIRU-VNTR para considerar a dos aislados como relacionados epidemiológicamente.
8. La existencia de infecciones complejas en tuberculosis humana o bovina no está exclusivamente asociada a las circunstancias que pudieran favorecerla, tales como riesgo de sobreexposición o duración de la infección.
9. El estudio exhaustivo de casos clínicos permitió identificar cepas de *Mycobacterium tuberculosis* con diferencias en su tendencia a adquirir variabilidad, sugiriendo la participación de factores bacterianos como moduladores de la microevolución.



10. La aplicación de una batería de ensayos de infección celular y animal, diferentes al modelo estándar, permitió detectar diferencias en infectividad entre variantes clonales de *Mycobacterium tuberculosis*.
11. El análisis *in silico* de los cambios genómicos adquiridos por microevolución sugiere un significado funcional, que es demostrado al documentarse tanto cambios de expresión en los genes localizados en el entorno de las modificaciones como diferencias en el comportamiento infectivo de las variantes clonales.

## RESUMEN/SUMMARY

---



## **RESUMEN**

Las herramientas de genotipado en tuberculosis fueron desarrolladas inicialmente para la realización de estudios epidemiológicos. Sin embargo han permitido asimismo desvelar la complejidad clonal existente en las infecciones causadas por *Mycobacterium tuberculosis* (MTB) y *Mycobacterium bovis* (*M. bovis*), poniendo así en cuestión la asunción de que cada episodio de tuberculosis (TB) estuviera causado por una única cepa. De este modo se comenzaron a describir situaciones de coinfección por más de una cepa (infección mixta) o bien de presencia simultánea de variantes clonales (infección policlonal), pudiendo estas, además, ofrecer una distribución heterogénea de las mismas en los diferentes tejidos infectados (infección compartimentalizada).

Sin embargo, son pocos los estudios existentes entorno a estos fenómenos, y los que se han realizado atienden a la mera descripción de casos anecdóticos o al estudio de estos eventos en poblaciones en donde la incidencia de TB es alta. Así, el primer objetivo de esta tesis se centró en dimensionar la complejidad clonal existente en las infecciones por MTB en una población no seleccionada, en un entorno de moderada incidencia, donde las expectativas de encontrar la citada complejidad eran escasas. Mediante el análisis por RFLP-IS6110 y MIRU-VNTR se detectaron infecciones complejas en 11 pacientes con TB pulmonar (1,6%) y en 10 pacientes con TB pulmonar y extrapulmonar (14,1%). De estos 21 casos, 9 correspondieron a infecciones mixtas y 12 a infecciones policlonales. Por último, en 9 casos (5 pacientes con infección mixta y 4 con infección policlonal) se documentó la compartimentalización de la infección.

Tras la descripción sistemática de los casos de TB con infecciones complejas, nos centramos en el estudio de una de sus modalidades, la infección policlonal. En concreto decidimos abordar la evaluación del posible significado funcional que pudiera conllevar la adquisición de las sutiles reorganizaciones genéticas identificadas entre variantes clonales, que surgen como resultado de eventos de microevolución.

Primeramente, mediante un estudio *in silico*, observamos las potenciales implicaciones derivadas de la modificación en el número de copias de la secuencia IS6110 y en el número de repeticiones MIRU-VNTR. El análisis detectó que algunas de estas variaciones se localizan intragénicamente, con una potencial repercusión sobre la estructura y función de las proteínas codificadas e incluso con un impacto funcional completo en los casos en los que la modificación truncaba el gen donde se localiza. Además, se identificaron modificaciones de repeticiones localizadas intergénicamente en algunos loci MIRU-VNTRs, que podían implicar un efecto en la expresión de genes adyacentes.

Tras el análisis *in silico* se pasó a objetivar experimentalmente el efecto en expresión génica que pudiera resultar de la variabilidad detectada en el número de repeticiones de ciertos loci intergénicos. Mediante la aplicación de RT-PCR cuantitativa en cuatro parejas de variantes clonales, se demostró que, en tres de los cuatro loci analizados, variaciones en 1 ó 2 repeticiones conducen a una modificación sutil en la expresión de los genes contiguos.

Finalmente, la evaluación del significado funcional de la microevolución debía incluir la comprobación de su impacto en la capacidad infectiva de las variantes. Partiendo de la premisa de que variaciones sutiles de infectividad pudieran no ser detectadas aplicando el modelo estándar de infección, realizamos cuatro modalidades de infección *in vitro* (macrófagos diferenciados a partir de la línea celular humana THP-1, con o sin activación por IFN- $\gamma$ ; infecciones individuales de cada variante y coinfecciones competitivas) gracias a las cuales se pudo documentar el efecto en infectividad asociado a las sutiles reorganizaciones genéticas mostradas entre variantes clonales.

Una vez analizada la dimensión de la complejidad clonal, y desvelado el impacto funcional de la microevolución, parecía oportuno estudiar estos eventos de modo exhaustivo en el seno de determinados pacientes seleccionados, representantes de diferentes circunstancias clínicas. Estos estudios nos permitieron valorar el modo en el que las infecciones complejas pueden repercutir en determinados aspectos diagnósticos y terapéuticos, así como obtener información de la dinámica de los fenómenos de microevolución que no es posible adquirir a partir de los estudios descriptivos poblacionales.

El primer estudio correspondió a una paciente con sospecha de TB-MDR en la que la existencia de una infección compleja no sospechada condujo a dificultades en su manejo diagnóstico y terapéutico. La integración de un análisis clonal exhaustivo con estrategias de epidemiología molecular así como con los datos clínicos/ epidemiológicos del caso y su contexto, permitió desvelar que la paciente presentaba realmente una infección mixta con una cepa sensible y otra MDR. La cepa sensible era de reciente adquisición, circulaba en el entorno de la paciente, y había coincidido con la reactivación de una cepa diferente, MDR, infrarrepresentada y con menor *fitness* que la cepa sensible, tres años después de la exposición a un caso índice infectado con esa misma cepa MDR.

El segundo caso correspondió a un paciente con dos episodios secuenciales de TB, como resultado de una reactivación, en el que se aislaron variantes clonales diferentes en cada episodio. Este caso fue utilizado como modelo de análisis integrado

de todas las estrategias analíticas desarrolladas a lo largo de este trabajo. Así, las variantes clonales fueron estudiadas por RFLP-IS6110 y MIRU-VNTR, mostrando variaciones en ambos marcadores. El análisis por WGS reveló la presencia de variabilidad de SNPs. La integración de todos estos datos permitió trazar la dinámica de microevolución acontecida, demostrando que cada variante había evolucionado de manera independiente a partir de una cepa parental. Ensayos de expresión demostraron que la variabilidad adquirida conducía a diferencias de expresión entre las variantes. Por último la aplicación sistemática de diversos modelos permitió identificar, en concreto en el modelo de infección competitiva en ratones Balb/c, una mayor capacidad infectiva de la variante aislada en el segundo episodio. Adicionalmente, una nueva variante emergió por microevolución durante un ensayo de infección *in vitro* en macrófagos y demostró tener un mayor *fitness* que la cepa parental. Todos los datos acumulados del estudio integrado de este paciente permitieron, adicionalmente, identificar una cepa con alta capacidad de adquirir variabilidad. Este hecho sugiere que los eventos de microevolución, además de poder estar modulados por circunstancias clínicas y epidemiológicas, dependen de factores exclusivamente bacterianos.

El tercer caso analizado nos condujo a reforzar la hipótesis de la existencia de factores bacterianos implicados en los eventos de microevolución, puesto que condujo a la identificación de una cepa de baja tendencia a adquirir variabilidad, que complementa a la cepa de alta tendencia descrita en el caso anterior. Este caso correspondió a un paciente infectado persistentemente, durante 8 años, por una cepa Beijing que había sido responsable de un brote de grandes dimensiones en el pasado. La infección prolongada fue resultado de una mala adherencia terapéutica, la cual condujo a un tratamiento intermitente. Sorprendentemente, a pesar de las enormes oportunidades que ofrecía este escenario para la generación de microevolución, no se identificó la aparición de mutaciones de resistencia ni variaciones en ninguno de los marcadores genotípicos habituales. Asimismo, la secuenciación de genoma completo no identificó la generación de ningún SNP a lo largo de toda la infección.

Una vez abordado el estudio de la complejidad clonal existente en la tuberculosis humana, analizados estos eventos en diversos ejemplos clínicos, y detectado el impacto funcional de la microevolución en MTB, quisimos transferir estrategias de análisis equivalentes, así como los conocimientos obtenidos, al abordaje del estudio de la complejidad clonal en TB bovina. Debido, en parte, al retraso en la implantación de estrategias de genotipado de alta discriminación en la caracterización de los aislados de *Mycobacterium bovis* (*M. bovis*), las lagunas de conocimiento en relación a estos aspectos eran muy extensas.

Los estudios en MTB han demostrado que la técnica de MIRU-VNTR es la que ofrece una óptima identificación de infecciones mixtas y policlonales, y por tanto estudios equivalentes en *M. bovis* deberían poder aplicarla. Por ello, nuestro primer objetivo fue adaptar y optimizar esta técnica a la caracterización de *M. bovis*, desarrollando un diseño de PCR multiplex con análisis de productos en electroforesis capilar y asignación automática de alelos. La selección de loci la realizamos a partir de un estudio de epidemiología molecular en TB bovina, realizado en nuestro país, que identificó un panel de 9 loci como el idóneo para ofrecer una elevada discriminación. La aplicación de nuestro ensayo a una muestra de aislados de *M. bovis* demostró su eficiencia y poder discriminativo.

Una vez puesta a punto la metodología idónea para abordar adecuadamente el fenómeno de las infecciones complejas por *M. bovis*, decidimos realizar un primer análisis focalizándonos en la modalidad más extrema e infrecuente de complejidad clonal, la infección compartimentalizada. Tras la selección de todos los animales de una población con aislamiento de *M. bovis* en dos o más localizaciones anatómicas diferentes y la comparación entre los espigotipos, se desveló que 6 (10,9%) de ellos estaban infectados por cepas diferentes. Mediante la aplicación adicional de MIRU-VNTR se confirmó que la compartimentalización era estricta, con una única cepa seleccionada en cada localización. El análisis adicional de animales infectados de esas mismas explotaciones permitió trazar la presencia de las cepas implicadas en la compartimentalización en animales independientes, indicando que el evento se inició con una sobreinfección.

Finalmente, la existencia de explotaciones infectadas crónicamente por *M. bovis* ofrecía la oportunidad de abordar un estudio cronológico longitudinal de la dinámica en la que ocurre la microevolución en *M. bovis*, aspecto que no es posible abordar fácilmente en la TB humana. Este estudio podría considerarse como un modelo de análisis de la variabilidad que se puede adquirir por microevolución. Con este fin se seleccionaron 8 explotaciones de ganado vacuno que habían estado infectadas durante más de un año por una misma cepa. Se abordó un esquema de análisis por MIRU-VNTR secuencial de los aislados obtenidos a lo largo de la infección que reveló la existencia de microevolución en la mitad de las explotaciones estudiadas. Esta microevolución involucraba a distintos linajes e implicaba a diversos loci MIRU-VNTR. Se observó cómo la aparición de variantes clonales es independiente del tiempo de infección y del número de animales infectados. Además, se pudo observar cómo la variante generada por microevolución reemplazó a la cepa inicial en 2 de 3 explotaciones, sugiriendo una mayor aptitud infectiva.

En resumen, esta tesis constituye un avance en cuanto al análisis de los fenómenos de complejidad clonal tanto en la tuberculosis humana como bovina; desarrolla metodología y estrategias analíticas para optimizar su detección y abordar su caracterización y profundiza en el conocimiento de su significado funcional. Todos estos aspectos confluyen en un nuevo estado de conocimiento que facilitará la progresión futura en este ámbito de estudio.



## **SUMMARY**

Genotyping tools in tuberculosis were initially developed for epidemiological studies. However, they have also revealed the existence of clonally complex infections caused by *Mycobacterium tuberculosis* (MTB) and *Mycobacterium bovis* (*M. bovis*), thus questioning the assumption that each episode of tuberculosis (TB) is caused by a single strain. Coinfection by more than one strain (mixed infection), simultaneous presence of clonal variants (polyclonal infection) and even heterogeneous distribution of strains or clonal variants in different infected tissues (compartmentalized infection) have been described.

However, there are few studies focused on these phenomena, and those correspond to the description of anecdotal cases or the analysis of these events in populations with high TB incidence. Thus, the first objective of this thesis focused on defining the magnitude in which clonally complex infections by MTB occur in an unselected population, in a context with moderate incidence, where the expectations of detecting this kind of infections are limited. By applying IS6110-RFLP and MIRU-VNTR analysis, clonally complex infections were detected in 11 (1.6%) and 10 (14.1%) patients with exclusively pulmonary TB and both pulmonary and extrapulmonary TB respectively. Nine out of these 21 cases were mixed infections and the remaining 12 corresponded to polyclonal infections. Finally, in 9 cases (5 patients with mixed infection and 4 patients with polyclonal infection) compartmentalization of the infection was documented.

Once the systematic description of clonally complex infections was done, we focused on the study of polyclonal infections. Specifically, to evaluate the potential functional meaning associated to the acquisition of subtle genetic rearrangements by microevolution phenomena.

First, we evaluated the potential *in silico* meaning of the variations in the number of IS6110 copies and in the number of repetitions in MIRU-VNTR loci. The analysis detected that some of these variations are located intragenically, which means either a potential impact on the structure and function of the encoded proteins, or even a loss of function when the modification truncates the reading frame of the gene. In addition, variations were also located in intergenic MIRU-VNTR loci, which could mean a potential effect on the expression of adjacent genes.

After the *in silico* analysis, we evaluated the effect that could cause on gene expression the variability in the number of repetitions mapping in intergenic loci. By applying quantitative RT-PCR on four pairs of related clonal variants, we showed that in

three of the four analyzed loci, variations in 1 or 2 repetitions led to a subtle change in the expression of the adjacent genes.

Finally, evaluation of the functional significance of microevolution should include the study of the infectivity of the involved clonal variants. With the premise that subtle variations in infectivity might not be detected by applying standard infection models, we performed four different versions of *in vitro* infection models (macrophages differentiated from the THP-1 human cell line, activated with or without IFN- $\gamma$ ; individual infections with each clonal variant and competitive coinfections), which allowed us to detect the effect of subtle genetic rearrangements on infectivity.

Once analyzed the proportion of clonally complex infections, and revealed the functional impact of microevolution, it was necessary to study these events on a selection of patients, representative of different clinical circumstances. These studies allowed us to assess the way in which complex infections can interfere with diagnostic and therapeutic aspects, as well as to get information on the dynamics of the microevolution phenomena, that cannot be obtained from the descriptive population-based studies.

The first study corresponded to a patient with suspected MDR-TB who met difficulties on her diagnosis and treatment due to the involvement of a non-suspected complex infection. An integrative analysis combining clonal analysis, molecular epidemiology strategies, clinical and epidemiological data, allowed us to reveal that the patient actually had a mixed infection with two MTB strains, one susceptible and another MDR. The susceptible strain was circulating in the epidemiological context of the patient and it had been recently acquired, and coincided with the reactivation of a MDR strain, three years after exposure to the index case infected with the same strain. The MDR strain was underrepresented in the patient with mixed infection and it showed lower fitness than the susceptible strain.

The second case corresponded to a patient with two sequential TB episodes, as a result of reactivation, with different clonal variants isolated from each episode. This case was used as a model of analysis integrating all the strategies developed in this thesis. Thus, clonal variants were genotyped by IS6110-RFLP and MIRU-VNTR, showing variations in both markers. WGS analysis revealed the presence of SNPs between the variants. The integration of these data allowed us to define precisely the microevolution dynamics, showing that each variant had evolved independently from a common parental strain. Expression assays demonstrated that the acquired variability led to differences in the expression between variants. Finally, the systematic application of several models of infection identified a higher infectivity for the variant isolated in the second episode, as

shown by applying a competitive infection model in Balb/c mice. Additionally, a new variant emerged by microevolution during an *in vitro* infection assay and this new variant had higher fitness than the parental strain. All data from the integrated study of this patient allowed us to consider a high ability to acquire variability for the involved strain. This suggests that the microevolution events, in addition to be modulated by clinical and epidemiological circumstances, also lie on bacterial factors.

The third case analyzed reinforced the hypothesis of the existence of a role in the microevolution events for bacterial factors, because involved a strain with a low tendency to acquire variability. This case corresponded to a patient persistently infected, along 8 years, with a Beijing strain that had been responsible for a large outbreak in the past. Prolonged infection in this case was a result of poor adherence to therapy, which meant an intermittent treatment. Surprisingly, despite the huge opportunities offered by this scenario for the detection of microevolution, no resistance mutations or any variations were identified by analyzing the standard genotypic markers. Even whole genome sequencing failed to identify SNPs throughout the infection period.

Once fulfilled the study of clonal complexity in human tuberculosis, we decided to transfer equivalent analytical strategies and the acquired knowledge to study of the clonal complexity in bovine TB (bTB). Due to the delay experienced in the implementation of highly-discriminating genotyping strategies for the characterization of *Mycobacterium bovis* (*M. bovis*) isolates, the knowledge gaps in relation to clonal complexity were wide.

The experience with MTB indicated that MIRU-VNTR offers the best choice to an accurate identification of polyclonal and mixed infections, and therefore, equivalent studies in *M. bovis* should include it. Our first objective was to adapt and optimize this technique to the characterization of *M. bovis*. We developed a multiplex PCR followed by an analysis of PCR products by capillary electrophoresis and automatic allelic assignment. A panel of 9 loci, suitable to offer a high discrimination, was selected based on data from a study of molecular epidemiology in bTB performed in our country. The application of our new methodology on a sample of *M. bovis* isolates showed its efficiency and discriminative power.

When the methodology to address the phenomenon of clonal complexity in *M. bovis* infections was optimized, we decided to perform a first analysis by focusing on the most extreme and uncommon version of clonal complexity, the compartmentalized infection. All the animals in a population with *M. bovis* isolation from two or more different anatomical sites were selected, and their spoligotypes were compared. Six (10.9%) of them were infected by different strains. The additional analysis by MIRU-VNTR confirmed

that the compartmentalization was strict, with a single strain at each location. Further analysis of infected animals in the same herds allowed us to trace the presence, in independent animals, of the strains involved in the compartmentalization, indicating that it was caused by overexposure.

Finally, the existence of farms chronically infected with *M. bovis* offered the opportunity to address a chronological study of the dynamics of microevolution, an issue that cannot be easily addressed in human TB. This study could be considered as a model for analyzing the variability that can be acquired by microevolution. Eight farms that had been infected along more than one year by a single strain were selected. The MIRU-VNTR analysis of sequential isolates obtained during the infection revealed the existence of microevolution in half of the farms studied. Microevolution involved different lineages and different MIRU-VNTR loci. We observed that the emergence of clonal variants did not depend on the length of the infection or on the total number of infected animals. Furthermore, it was observed how the clonal variants, generated by microevolution, replaced the initial strain in 2 out of 3 farms, suggesting a higher infective ability for these emerged variants.

In summary, this thesis means an advance regarding the analysis of clonal complexity in human and animal TB; it develops methodology and analytical strategies to optimize its detection and characterization allowing a more in depth knowledge of its functional meaning. All these aspects support a new knowledge status which will facilitate the progress in this field.



## ABREVIATURAS

---



AAR: ácido-alcohol resistencia

ADN: ácido desoxirribonucleico

ARNr: ácido ribonucleico ribosómico

ASO-PCR: reacción en cadena de la polimerasa alelo específica (*Allele Specific Oligonucleotide-Polymerase Chain Reaction*)

BCG: Bacilo de Calmette y Guérin

DR: repetición directa (*Direct Repeat*)

DVR: repetición directa variable (*Direct Variable Repeat*)

ELISA: ensayo inmunoenzimático (*Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*)

EMB: etambutol

ESAT-6: *Early Secreted Antigenic Target 6kDa*

ETR: repetición en tándem exacta (*Exact Tandem Repeats*)

IDTB: intradermotuberculinización

IFN- $\gamma$ : interferón gamma

IGRA: ensayo de detección del interferón gamma (*Interferon Gamma Release Assays*)

INH: isoniazida

IS6110: secuencia de inserción 6110 (*insertion sequence 6110*)

LM-PCR: reacción en cadena de la polimerasa mediada por ligación (*Ligation Mediated-Polymerase Chain Reaction*)

MAF1: *Mycobacterium africanum* tipo I West African 1

MAF2: *Mycobacterium africanum* tipo I West African 2

MDR: multirresistente

MGIT: tubo indicador del crecimiento de micobacterias (*Mycobacteria Growth Indicator Tube*)

MIRU: unidad de repetición intercalada micobacteriana (*Mycobacterial Interspersed Repetitive Unit*)

MTB: *Mycobacterium tuberculosis*

MTBC: complejo *Mycobacterium tuberculosis*

OMS: Organización Mundial de la Salud



OTF: oficialmente libre de tuberculosis (*Oficial Tuberculosis Free*)

PCR: reacción en cadena de la polimerasa (*Polymerase Chain Reaction*)

PPD: derivado proteico purificado

PvuII: endonucleasa de restricción tipo II, aislada de *Proteus vulgaris*

PZA: pirazinamida

QUB: *Queen's University Belfast*

RD: regiones de diferencia (*Regions of Difference*)

RFLP: análisis de polimorfismos en los fragmentos de restricción (*Restriction Fragment Length Polymorphism*)

RIF: rifampicina

SIDA: Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida

SNP: polimorfismo de un solo nucleótido (*Single Nucleotide Polimorphism*)

TB: tuberculosis

TBb: tuberculosis bovina

UE: Unión Europea

VIH: Virus de la Inmunodeficiencia Humana

VNTR: número variable de repeticiones en tándem (*Variable Number Tandem Repeat*)

WGS: secuenciación de genoma completo (*Whole Genome Sequencing*)

XDR: extensivamente resistente

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

---



- Abdul-Majid, K.B., Ly, L.H., Converse, P.J., Geiman, D.E., McMurray, D.N., Bishai, W.R., 2008, Altered cellular infiltration and cytokine levels during early *Mycobacterium tuberculosis* sigC mutant infection are associated with late-stage disease attenuation and milder immunopathology in mice. *BMC Microbiol* 8, 151.
- Adesokan, H.K., Jenkins, A.O., van Soolingen, D., Cadmus, S.I., 2012, *Mycobacterium bovis* infection in livestock workers in Ibadan, Nigeria: evidence of occupational exposure. *Int J Tuberc Lung Dis* 16, 1388-1392.
- Aidar, O., Ambroggi, M., José, A.J., Brian, M.C., Canedo, E., Cufre, M., Curras, V., Montaner, P.G., Krugliansky, S., Leidi, N., Moraña, E., Pizzariello, G., Reggiani, J.L., Rizzo, C., Vescovo, M., 2010, Guías de diagnóstico, tratamiento y prevención de la tuberculosis. IntraMed.
- Akhtar, P., Singh, S., Bifani, P., Kaur, S., Srivastava, B.S., Srivastava, R., 2009, Variable-number tandem repeat 3690 polymorphism in Indian clinical isolates of *Mycobacterium tuberculosis* and its influence on transcription. *J Med Microbiol* 58, 798-805.
- Al-Hajoj, S.A., Akkerman, O., Parwati, I., al-Gamdi, S., Rahim, Z., van Soolingen, D., van Ingen, J., Supply, P., van der Zanden, A.G., 2010, Microevolution of *Mycobacterium tuberculosis* in a tuberculosis patient. *J Clin Microbiol* 48, 3813-3816.
- Alcaide Fernández de Vega, F., Esteban Moreno, J., González Martín, J., J., P.G.J., 2005, Micobacterias, In: Cercenado, E., Cantón, R. (Eds.) *Procedimientos en microbiología clínica. Recomendaciones de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*.
- Alexander, K.A., Laver, P.N., Michel, A.L., Williams, M., van Helden, P.D., Warren, R.M., Gey van Pittius, N.C., 2010, Novel *Mycobacterium tuberculosis* complex pathogen, *M. mungi*. *Emerg Infect Dis* 16, 1296-1299.
- Alonso, M., Herranz, M., Martinez Lirola, M., Gonzalez-Rivera, M., Bouza, E., Garcia de Viedma, D., 2012, Real-time molecular epidemiology of tuberculosis by direct genotyping of smear-positive clinical specimens. *J Clin Microbiol* 50, 1755-1757.
- Allix-Beguec, C., Fauville-Dufaux, M., Supply, P., 2008, Three-year population-based evaluation of standardized mycobacterial interspersed repetitive-unit-variable-number tandem-repeat typing of *Mycobacterium tuberculosis*. *J Clin Microbiol* 46, 1398-1406.
- Allix, C., Supply, P., Fauville-Dufaux, M., 2004, Utility of fast mycobacterial interspersed repetitive unit-variable number tandem repeat genotyping in clinical mycobacteriological analysis. *Clin Infect Dis* 39, 783-789.
- Allix, C., Walravens, K., Saegerman, C., Godfroid, J., Supply, P., Fauville-Dufaux, M., 2006, Evaluation of the epidemiological relevance of variable-number tandem-repeat genotyping of *Mycobacterium bovis* and comparison of the method with IS6110 restriction fragment length polymorphism analysis and spoligotyping. *J Clin Microbiol* 44, 1951-1962.
- Ameni, G., Desta, F., Firdessa, R., 2010, Molecular typing of *Mycobacterium bovis* isolated from tuberculosis lesions of cattle in north eastern Ethiopia. *Vet Rec* 167, 138-141.

- Ameni, G., Vordermeier, M., Firdessa, R., Aseffa, A., Hewinson, G., Gordon, S.V., Berg, S., 2011, *Mycobacterium tuberculosis* infection in grazing cattle in central Ethiopia. *Vet J* 188, 359-361.
- Andrade, M.K., Machado, S.M., Leite, M.L., Saad, M.H., 2009, Phenotypic and genotypic variant of MDR-*Mycobacterium tuberculosis* multiple isolates in the same tuberculosis episode, Rio de Janeiro, Brazil. *Braz J Med Biol Res* 42, 433-437.
- Aranaz, A., Cousins, D., Mateos, A., Dominguez, L., 2003, Elevation of *Mycobacterium tuberculosis* subsp. *caprae* Aranaz et al. 1999 to species rank as *Mycobacterium caprae* comb. nov., sp. nov. *Int J Syst Evol Microbiol* 53, 1785-1789.
- Aranaz, A., Liebana, E., Gomez-Mampaso, E., Galan, J.C., Cousins, D., Ortega, A., Blazquez, J., Baquero, F., Mateos, A., Suarez, G., Dominguez, L., 1999, *Mycobacterium tuberculosis* subsp. *caprae* subsp. nov.: a taxonomic study of a new member of the *Mycobacterium tuberculosis* complex isolated from goats in Spain. *Int J Syst Bacteriol* 49 Pt 3, 1263-1273.
- Aranaz, A., Liebana, E., Mateos, A., Dominguez, L., Vidal, D., Domingo, M., Gonzolez, O., Rodriguez-Ferri, E.F., Bunschoten, A.E., Van Embden, J.D., Cousins, D., 1996, Spacer oligonucleotide typing of *Mycobacterium bovis* strains from cattle and other animals: a tool for studying epidemiology of tuberculosis. *J Clin Microbiol* 34, 2734-2740.
- Bandera, A., Gori, A., Catozzi, L., Degli Esposti, A., Marchetti, G., Molteni, C., Ferrario, G., Codecasa, L., Penati, V., Matteelli, A., Franzetti, F., 2001, Molecular epidemiology study of exogenous reinfection in an area with a low incidence of tuberculosis. *J Clin Microbiol* 39, 2213-2218.
- Bauer, J., Andersen, A.B., Kremer, K., Miorner, H., 1999, Usefulness of spoligotyping To discriminate IS6110 low-copy-number *Mycobacterium tuberculosis* complex strains cultured in Denmark. *J Clin Microbiol* 37, 2602-2606.
- Behr, M.A., Mostowy, S., 2007, Molecular tools for typing and branding the tubercle bacillus. *Curr Mol Med* 7, 309-317.
- Bernard, C., Brossier, F., Frechet-Jachym, M., Morand, P.C., Coignard, S., Aslangul, E., Aubry, A., Jarlier, V., Sougakoff, W., Veziris, N., 2014, Concomitant multidrug-resistant pulmonary tuberculosis and susceptible tuberculous meningitis. *Emerg Infect Dis* 20, 506-507.
- Bezoz, J., Casal, C., Romero, B., Schroeder, B., Hardegger, R., Raeber, A.J., Lopez, L., Rueda, P., Dominguez, L., 2014, Current ante-mortem techniques for diagnosis of bovine tuberculosis. *Res Vet Sci* 97 Suppl, S44-52.
- Bidovec-Stojkovic, U., Seme, K., Zolnir-Dovc, M., Supply, P., 2014, Prospective genotyping of *Mycobacterium tuberculosis* from fresh clinical samples. *PLoS One* 9, e109547.
- Biffa, D., Johansen, T.B., Godfroid, J., Muwonge, A., Skjerve, E., Djonje, B., 2014, Multi-locus variable-number tandem repeat analysis (MLVA) reveals heterogeneity of *Mycobacterium bovis* strains and multiple genotype infections of cattle in Ethiopia. *Infect Genet Evol* 23, 13-19.

- Biffa, D., Skjerve, E., Oloya, J., Bogale, A., Abebe, F., Dahle, U., Bohlin, J., Djonne, B., 2010, Molecular characterization of *Mycobacterium bovis* isolates from Ethiopian cattle. BMC Vet Res 6, 28.
- Birkness, K.A., Deslauriers, M., Bartlett, J.H., White, E.H., King, C.H., Quinn, F.D., 1999, An in vitro tissue culture bilayer model to examine early events in *Mycobacterium tuberculosis* infection. Infect Immun 67, 653-658.
- Boddinghaus, B., Rogall, T., Flohr, T., Blocker, H., Bottger, E.C., 1990, Detection and identification of mycobacteria by amplification of rRNA. J Clin Microbiol 28, 1751-1759.
- Bodnar, K.A., Serbina, N.V., Flynn, J.L., 2001, Fate of *Mycobacterium tuberculosis* within murine dendritic cells. Infect Immun 69, 800-809.
- Bolado-Martinez, E., Benavides-Davila, I., Candia-Plata Mdel, C., Navarro-Navarro, M., Aviles-Acosta, M., Alvarez-Hernandez, G., 2015, Proposal of a Screening MIRU-VNTR Panel for the Preliminary Genotyping of *Mycobacterium bovis* in Mexico. Biomed Res Int 2015, 416479.
- Boniotti, M.B., Gaffuri, A., Gelmetti, D., Tagliabue, S., Chiari, M., Mangeli, A., Spisani, M., Nassuato, C., Gibelli, L., Sacchi, C., Zanoni, M., Pacciarini, M.L., 2014, Detection and molecular characterization of *Mycobacterium microti* isolates in wild boar from northern Italy. J Clin Microbiol 52, 2834-2843.
- Braden, C.R., Morlock, G.P., Woodley, C.L., Johnson, K.R., Colombel, A.C., Cave, M.D., Yang, Z., Valway, S.E., Onorato, I.M., Crawford, J.T., 2001, Simultaneous infection with multiple strains of *Mycobacterium tuberculosis*. Clin Infect Dis 33, e42-47.
- Braden, C.R., Templeton, G.L., Stead, W.W., Bates, J.H., Cave, M.D., Valway, S.E., 1997, Retrospective detection of laboratory cross-contamination of *Mycobacterium tuberculosis* cultures with use of DNA fingerprint analysis. Clin Infect Dis 24, 35-40.
- Brosch, R., Gordon, S.V., Marmiesse, M., Brodin, P., Buchrieser, C., Eiglmeier, K., Garnier, T., Gutierrez, C., Hewinson, G., Kremer, K., Parsons, L.M., Pym, A.S., Samper, S., van Soolingen, D., Cole, S.T., 2002, A new evolutionary scenario for the *Mycobacterium tuberculosis* complex. Proc Natl Acad Sci U S A 99, 3684-3689.
- Bryant, J.M., Harris, S.R., Parkhill, J., Dawson, R., Diacon, A.H., van Helden, P., Pym, A., Mahayiddin, A.A., Chuchottaworn, C., Sanne, I.M., Louw, C., Boeree, M.J., Hoelscher, M., McHugh, T.D., Bateson, A.L., Hunt, R.D., Mwaigwisya, S., Wright, L., Gillespie, S.H., Bentley, S.D., 2013, Whole-genome sequencing to establish relapse or re-infection with *Mycobacterium tuberculosis*: a retrospective observational study. Lancet Respir Med 1, 786-792.
- Buchmeier, N., Blanc-Potard, A., Ehrh, S., Piddington, D., Riley, L., Groisman, E.A., 2000, A parallel intraphagosomal survival strategy shared by *Mycobacterium tuberculosis* and *Salmonella enterica*. Mol Microbiol 35, 1375-1382.
- Cadmus, S., Palmer, S., Okker, M., Dale, J., Gover, K., Smith, N., Jahans, K., Hewinson, R.G., Gordon, S.V., 2006, Molecular analysis of human and bovine tubercle bacilli from a local setting in Nigeria. J Clin Microbiol 44, 29-34.

- Cadmus, S.I., Yakubu, M.K., Magaji, A.A., Jenkins, A.O., van Soolingen, D., 2010, *Mycobacterium bovis*, but also *M. africanum* present in raw milk of pastoral cattle in north-central Nigeria. *Trop Anim Health Prod* 42, 1047-1048.
- Camacho, L.R., Ensergueix, D., Perez, E., Gicquel, B., Guilhot, C., 1999, Identification of a virulence gene cluster of *Mycobacterium tuberculosis* by signature-tagged transposon mutagenesis. *Mol Microbiol* 34, 257-267.
- Casali, N., Nikolayevskyy, V., Balabanova, Y., Ignatyeva, O., Kontsevaya, I., Harris, S.R., Bentley, S.D., Parkhill, J., Nejentsev, S., Hoffner, S.E., Horstmann, R.D., Brown, T., Drobniewski, F., 2012, Microevolution of extensively drug-resistant tuberculosis in Russia. *Genome Res* 22, 735-745.
- Cassidy, J.P., Bryson, D.G., Neill, S.D., 1999, Tonsillar lesions in cattle naturally infected with *Mycobacterium bovis*. *Vet Rec* 144, 139-142.
- Castets, M., Boisvert, H., Grumbach, F., Brunel, M., Rist, N., 1968, [Tuberculosis bacilli of the African type: preliminary note]. *Rev Tuberc Pneumol (Paris)* 32, 179-184.
- Castets, M., Sarrat, H., 1969, [Experimental study of the virulence of *Mycobacterium africanum* (preliminary note)]. *Bull Soc Med Afr Noire Lang Fr* 14, 693-696.
- CDC, 2000, Targeted tuberculin testing and treatment of latent tuberculosis infection. . *MMWR Recomm Rep* 49, 1-51.
- CDC, 2003, Treatment of tuberculosis. *MMWR Recomm Rep* 52, 1-77.
- CDC 2010. T-SPOT.TB Package Insert. In *MMWR Recomm Rep*, pp. 1-25.
- Cohen, T., van Helden, P.D., Wilson, D., Colijn, C., McLaughlin, M.M., Abubakar, I., Warren, R.M., 2012, Mixed-strain *Mycobacterium tuberculosis* infections and the implications for tuberculosis treatment and control. *Clin Microbiol Rev* 25, 708-719.
- Cohen, T., Wilson, D., Wallengren, K., Samuel, E.Y., Murray, M., 2011, Mixed-strain *Mycobacterium tuberculosis* infections among patients dying in a hospital in KwaZulu-Natal, South Africa. *J Clin Microbiol* 49, 385-388.
- Colangeli, R., Arcus, V.L., Cursons, R.T., Ruthe, A., Karalus, N., Coley, K., Manning, S.D., Kim, S., Marchiano, E., Alland, D., 2014, Whole genome sequencing of *Mycobacterium tuberculosis* reveals slow growth and low mutation rates during latent infections in humans. *PLoS One* 9, e91024.
- Cole, S.T., Brosch, R., Parkhill, J., Garnier, T., Churcher, C., Harris, D., Gordon, S.V., Eiglmeier, K., Gas, S., Barry, C.E., 3rd, Tekaia, F., Badcock, K., Basham, D., Brown, D., Chillingworth, T., Connor, R., Davies, R., Devlin, K., Feltwell, T., Gentles, S., Hamlin, N., Holroyd, S., Hornsby, T., Jagels, K., Krogh, A., McLean, J., Moule, S., Murphy, L., Oliver, K., Osborne, J., Quail, M.A., Rajandream, M.A., Rogers, J., Rutter, S., Seeger, K., Skelton, J., Squares, R., Squares, S., Sulston, J.E., Taylor, K., Whitehead, S., Barrell, B.G., 1998, Deciphering the biology of *Mycobacterium tuberculosis* from the complete genome sequence. *Nature* 393, 537-544.
- Collins, D.M., Kawakami, R.P., Buddle, B.M., Wards, B.J., de Lisle, G.W., 2003, Different susceptibility of two animal species infected with isogenic mutants of *Mycobacterium bovis* identifies *phoT* as having roles in tuberculosis virulence and phosphate transport. *Microbiology* 149, 3203-3212.

- Collins, D.M., Kawakami, R.P., de Lisle, G.W., Pascopella, L., Bloom, B.R., Jacobs, W.R., Jr., 1995, Mutation of the principal sigma factor causes loss of virulence in a strain of the *Mycobacterium tuberculosis* complex. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92, 8036-8040.
- Converse, P.J., Dannenberg, A.M., Jr., Estep, J.E., Sugisaki, K., Abe, Y., Schofield, B.H., Pitt, M.L., 1996, Cavitary tuberculosis produced in rabbits by aerosolized virulent tubercle bacilli. *Infect Immun* 64, 4776-4787.
- Copin, R., Coscolla, M., Efstathiadis, E., Gagneux, S., Ernst, J.D., 2014, Impact of in vitro evolution on antigenic diversity of *Mycobacterium bovis* bacillus Calmette-Guerin (BCG). *Vaccine* 32, 5998-6004.
- Corcoran, J.P., Hallifax, R.J., Bettinson, H.V., Psallidas, I., Rahman, N.M., 2014, Tuberculous pleuritis secondary to *Mycobacterium bovis* in a veterinarian. *Clin Respir J*.
- Coscolla, M., Lewin, A., Metzger, S., Maetz-Renning, K., Calvignac-Spencer, S., Nitsche, A., Dabrowski, P.W., Radonic, A., Niemann, S., Parkhill, J., Couacy-Hymann, E., Feldman, J., Comas, I., Boesch, C., Gagneux, S., Leendertz, F.H., 2013, Novel *Mycobacterium tuberculosis* complex isolate from a wild chimpanzee. *Emerg Infect Dis* 19, 969-976.
- Costello, E., O'Grady, D., Flynn, O., O'Brien, R., Rogers, M., Quigley, F., Egan, J., Griffin, J., 1999, Study of restriction fragment length polymorphism analysis and spoligotyping for epidemiological investigation of *Mycobacterium bovis* infection. *J Clin Microbiol* 37, 3217-3222.
- Cousins, D.V., Bastida, R., Cataldi, A., Quse, V., Redrobe, S., Dow, S., Duignan, P., Murray, A., Dupont, C., Ahmed, N., Collins, D.M., Butler, W.R., Dawson, D., Rodriguez, D., Loureiro, J., Romano, M.I., Alifo, A., Zumarraga, M., Bernardelli, A., 2003, Tuberculosis in seals caused by a novel member of the *Mycobacterium tuberculosis* complex: *Mycobacterium pinnipedii* sp. nov. *Int J Syst Evol Microbiol* 53, 1305-1314.
- Chaves, F., Dronda, F., Alonso-Sanz, M., Noriega, A.R., 1999, Evidence of exogenous reinfection and mixed infection with more than one strain of *Mycobacterium tuberculosis* among Spanish HIV-infected inmates. *AIDS* 13, 615-620.
- Dankner, W.M., Waecker, N.J., Essey, M.A., Moser, K., Thompson, M., Davis, C.E., 1993, *Mycobacterium bovis* infections in San Diego: a clinicoepidemiologic study of 73 patients and a historical review of a forgotten pathogen. *Medicine (Baltimore)* 72, 11-37.
- Dawson, K.L., Bell, A., Kawakami, R.P., Coley, K., Yates, G., Collins, D.M., 2012, Transmission of *Mycobacterium orygis* (*M. tuberculosis* complex species) from a tuberculosis patient to a dairy cow in New Zealand. *J Clin Microbiol* 50, 3136-3138.
- de Beer, J.L., Akkerman, O.W., Schurch, A.C., Mulder, A., van der Werf, T.S., van der Zanden, A.G., van Ingen, J., van Soolingen, D., 2014, Optimization of standard in-house 24-locus variable-number tandem-repeat typing for *Mycobacterium tuberculosis* and its direct application to clinical material. *J Clin Microbiol* 52, 1338-1342.
- de Beer, J.L., van Ingen, J., de Vries, G., Erkens, C., Sebek, M., Mulder, A., Sloot, R., van den Brandt, A.M., Enaimi, M., Kremer, K., Supply, P., van Soolingen, D., 2013, Comparative study of IS6110 restriction fragment length polymorphism and variable-number tandem-repeat typing of *Mycobacterium tuberculosis* isolates in



- the Netherlands, based on a 5-year nationwide survey. *J Clin Microbiol* 51, 1193-1198.
- de Boer, A.S., Blommerde, B., de Haas, P.E., Sebek, M.M., Lambregts-van Weezenbeek, K.S., Dessens, M., van Soolingen, D., 2002, False-positive *Mycobacterium tuberculosis* cultures in 44 laboratories in The Netherlands (1993 to 2000): incidence, risk factors, and consequences. *J Clin Microbiol* 40, 4004-4009.
- de Boer, A.S., Kremer, K., Borgdorff, M.W., de Haas, P.E., Heersma, H.F., van Soolingen, D., 2000, Genetic heterogeneity in *Mycobacterium tuberculosis* isolates reflected in IS6110 restriction fragment length polymorphism patterns as low-intensity bands. *J Clin Microbiol* 38, 4478-4484.
- de Jong, B.C., Antonio, M., Gagneux, S., 2010, *Mycobacterium africanum*--review of an important cause of human tuberculosis in West Africa. *PLoS Negl Trop Dis* 4, e744.
- de la Cruz, M.L., Perez, A., Bezos, J., Pages, E., Casal, C., Carpintero, J., Romero, B., Dominguez, L., Barker, C.M., Diaz, R., Alvarez, J., 2014, Spatial dynamics of bovine tuberculosis in the Autonomous Community of Madrid, Spain (2010-2012). *PLoS One* 9, e115632.
- de la Paz Santangelo, M., Klepp, L., Nunez-Garcia, J., Blanco, F.C., Soria, M., Garcia-Pelayo, M.C., Bianco, M.V., Cataldi, A.A., Golby, P., Jackson, M., Gordon, S.V., Bigi, F., 2009, Mce3R, a TetR-type transcriptional repressor, controls the expression of a regulon involved in lipid metabolism in *Mycobacterium tuberculosis*. *Microbiology* 155, 2245-2255.
- Deforges, L., Boulouis, H.J., Thibaud, J.L., Boulouha, L., Sougakoff, W., Blot, S., Hewinson, G., Truffot-Pernot, C., Haddad, N., 2004, First isolation of *Mycobacterium microti* (Llama-type) from a dog. *Vet Microbiol* 103, 249-253.
- Dickman, K.R., Nabyonga, L., Kateete, D.P., Katabazi, F.A., Asiimwe, B.B., Mayanja, H.K., Okwera, A., Whalen, C., Joloba, M.L., 2010, Detection of multiple strains of *Mycobacterium tuberculosis* using MIRU-VNTR in patients with pulmonary tuberculosis in Kampala, Uganda. *BMC Infect Dis* 10, 349.
- Drobniewski, F., Cooke, M., Jordan, J., Casali, N., Mugwagwa, T., Broda, A., Townsend, C., Sivaramakrishnan, A., Green, N., Jit, M., Lipman, M., Lord, J., White, P.J., Abubakar, I., 2015, Systematic review, meta-analysis and economic modelling of molecular diagnostic tests for antibiotic resistance in tuberculosis. *Health Technol Assess* 19, 1-188, vii-viii.
- Ebrahimi-Rad, M., Bifani, P., Martin, C., Kremer, K., Samper, S., Rauzier, J., Kreiswirth, B., Blazquez, J., Jouan, M., van Soolingen, D., Gicquel, B., 2003, Mutations in putative mutator genes of *Mycobacterium tuberculosis* strains of the W-Beijing family. *Emerg Infect Dis* 9, 838-845.
- Edlin, B.R., Tokars, J.I., Grieco, M.H., Crawford, J.T., Williams, J., Sordillo, E.M., Ong, K.R., Kilburn, J.O., Dooley, S.W., Castro, K.G., et al., 1992, An outbreak of multidrug-resistant tuberculosis among hospitalized patients with the acquired immunodeficiency syndrome. *N Engl J Med* 326, 1514-1521.
- Edwards, K.M., Cynamon, M.H., Voladri, R.K., Hager, C.C., DeStefano, M.S., Tham, K.T., Lakey, D.L., Bochan, M.R., Kernodle, D.S., 2001, Iron-cofactored superoxide

- dismutase inhibits host responses to *Mycobacterium tuberculosis*. Am J Respir Crit Care Med 164, 2213-2219.
- EFSA, 2003, Opinion of the Scientific Panel on Biological Hazards on a request from the Commission related on "Tuberculosis in Bovine Animals: Risks for human health and control strategies" the Journal 13, 1-52.
- EFSA, ECDC 2015. Scientific report of EFSA and ECDC. Trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2013. In EFSA Journal, p. 3991.
- Eldholm, V., Norheim, G., von der Lippe, B., Kinander, W., Dahle, U.R., Caugant, D.A., Mannsaker, T., Mengshoel, A.T., Dyrhol-Riise, A.M., Balloux, F., 2014, Evolution of extensively drug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* from a susceptible ancestor in a single patient. Genome Biol 15, 490.
- Engelmann, N., Ondreka, N., Michalik, J., Neiger, R., 2014, Intra-abdominal *Mycobacterium tuberculosis* infection in a dog. J Vet Intern Med 28, 934-938.
- Etienne, C.L., Granat, F., Trumel, C., Raymond-Letron, I., Lucas, M.N., Boucraut-Baralon, C., Pingret, J.L., Magne, L., Delverdier, M., 2013, A mycobacterial coinfection in a dog suspected on blood smear. Vet Clin Pathol 42, 516-521.
- Ewann, F., Jackson, M., Pethe, K., Cooper, A., Mielcarek, N., Ensergueix, D., Gicquel, B., Locht, C., Supply, P., 2002, Transient requirement of the PrrA-PrrB two-component system for early intracellular multiplication of *Mycobacterium tuberculosis*. Infect Immun 70, 2256-2263.
- Fanlo, P., Tiberio, G., 2007, [Extrapulmonary tuberculosis]. An Sist Sanit Navar 30 Suppl 2, 143-162.
- Faye, S., Moyen, J.L., Gares, H., Benet, J.J., Garin-Bastuji, B., Boschirolì, M.L., 2011, Determination of decisional cut-off values for the optimal diagnosis of bovine tuberculosis with a modified IFNgamma assay (Bovigam(R)) in a low prevalence area in France. Vet Microbiol 151, 60-67.
- Feuerriegel, S., Koser, C.U., Richter, E., Niemann, S., 2013, *Mycobacterium canettii* is intrinsically resistant to both pyrazinamide and pyrazinoic acid. J Antimicrob Chemother 68, 1439-1440.
- Fine, P.E., 1995, Variation in protection by BCG: implications of and for heterologous immunity. Lancet 346, 1339-1345.
- Francis, J., 1958, Tuberculosis in animals and man. A Study in Comparative Pathology. Cassell, London.
- Frank, W., Reisinger, E.C., Brandt-Hamerla, W., Schwede, I., Handrick, W., 2009, *Mycobacterium microti*-pulmonary tuberculosis in an immunocompetent patient. Wien Klin Wochenschr 121, 282-286.
- Furphy, C., Costello, E., Murphy, D., Corner, L.A., Gormley, E., 2012. DNA typing of *Mycobacterium bovis* isolates from badgers (*Meles meles*) culled from areas in Ireland with different levels of tuberculosis prevalence. Vet. Med. Int. 742478 .
- Galagan, J.E., Sisk, P., Stolte, C., Weiner, B., Koehrsen, M., Wymore, F., Reddy, T.B., Zucker, J.D., Engels, R., Gellesch, M., Hubble, J., Jin, H., Larson, L., Mao, M., Nitzberg, M.,

- White, J., Zachariah, Z.K., Sherlock, G., Ball, C.A., Schoolnik, G.K., 2010, TB database 2010: overview and update. *Tuberculosis (Edinb)* 90, 225-235.
- Garcia-Jimenez, W.L., Benitez-Medina, J.M., Fernandez-Llario, P., Abecia, J.A., Garcia-Sanchez, A., Martinez, R., Risco, D., Ortiz-Pelaez, A., Salguero, F.J., Smith, N.H., Gomez, L., Hermoso de Mendoza, J., 2013, Comparative pathology of the natural infections by *Mycobacterium bovis* and by *Mycobacterium caprae* in wild boar (*Sus scrofa*). *Transbound Emerg Dis* 60, 102-109.
- Garcia de Viedma, D., Alonso Rodriguez, N., Andres, S., Ruiz Serrano, M.J., Bouza, E., 2005a, Characterization of clonal complexity in tuberculosis by mycobacterial interspersed repetitive unit-variable-number tandem repeat typing. *J Clin Microbiol* 43, 5660-5664.
- Garcia de Viedma, D., Lorenzo, G., Cardona, P.J., Rodriguez, N.A., Gordillo, S., Serrano, M.J., Bouza, E., 2005b, Association between the infectivity of *Mycobacterium tuberculosis* strains and their efficiency for extrarespiratory infection. *J Infect Dis* 192, 2059-2065.
- Garcia de Viedma, D., Marin, M., Andres, S., Lorenzo, G., Ruiz-Serrano, M.J., Bouza, E., 2006, Complex clonal features in an *Mycobacterium tuberculosis* infection in a two-year-old child. *Pediatr Infect Dis J* 25, 457-459.
- Garcia de Viedma, D., Marin, M., Hernangomez, S., Diaz, M., Ruiz Serrano, M.J., Alcala, L., Bouza, E., 2002, Tuberculosis recurrences: reinfection plays a role in a population whose clinical/epidemiological characteristics do not favor reinfection. *Arch Intern Med* 162, 1873-1879.
- Garnier, T., Eiglmeier, K., Camus, J.C., Medina, N., Mansoor, H., Pryor, M., Duthoy, S., Grondin, S., Lacroix, C., Monsempe, C., Simon, S., Harris, B., Atkin, R., Doggett, J., Mayes, R., Keating, L., Wheeler, P.R., Parkhill, J., Barrell, B.G., Cole, S.T., Gordon, S.V., Hewinson, R.G., 2003, The complete genome sequence of *Mycobacterium bovis*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 7877-7882.
- Gey van Pittius, N.C., van Helden, P.D., Warren, R.M., 2012, Characterization of *Mycobacterium orygis*. *Emerg Infect Dis* 18, 1708-1709.
- Ghodbane, R., Drancourt, M., 2013, Non-human sources of *Mycobacterium tuberculosis*. *Tuberculosis (Edinb)* 93, 589-595.
- Glickman, M.S., Jacobs, W.R., Jr., 2001, Microbial pathogenesis of *Mycobacterium tuberculosis*: dawn of a discipline. *Cell* 104, 477-485.
- Glynn, J.R., Murray, J., Bester, A., Nelson, G., Shearer, S., Sonnenberg, P., 2010, High rates of recurrence in HIV-infected and HIV-uninfected patients with tuberculosis. *J Infect Dis* 201, 704-711.
- Goguet de la Salmoniere, Y.O., Li, H.M., Torrea, G., Bunschoten, A., van Embden, J., Gicquel, B., 1997, Evaluation of spoligotyping in a study of the transmission of *Mycobacterium tuberculosis*. *J Clin Microbiol* 35, 2210-2214.
- Gold, B., Rodriguez, G.M., Marras, S.A., Pentecost, M., Smith, I., 2001, The *Mycobacterium tuberculosis* IdeR is a dual functional regulator that controls transcription of genes involved in iron acquisition, iron storage and survival in macrophages. *Mol Microbiol* 42, 851-865.

- Gonzalez-Martín, J., García-García, J.M., Aníbarro, L., Vidal, R., Esteban, J., Blanquer, R., Moreno, S., Ruiz-Manzano, J., 2010, Documento de consenso sobre diagnóstico, tratamiento y prevención de la tuberculosis. *Arch Bronconeumol* 46, 255–274.
- Goodchild, A.V., Clifton-Hadley, R.S., 2001, Cattle-to-cattle transmission of *Mycobacterium bovis*. *Tuberculosis (Edinb)* 81, 23-41.
- Gordon, S.V., Brosch, R., Billault, A., Garnier, T., Eiglmeier, K., Cole, S.T., 1999, Identification of variable regions in the genomes of tubercle bacilli using bacterial artificial chromosome arrays. *Mol Microbiol* 32, 643-655.
- Grupo de trabajo de la Guía de Práctica Clínica sobre el Diagnóstico, e.T.y.l.P.d.I.T.C.C.I., coordinador. 2009. Guía de Práctica Clínica sobre el Diagnóstico, el Tratamiento y la Prevención de la Tuberculosis, Plan de Calidad para el Sistema Nacional de Salud del Ministerio de Sanidad, P.S.e.l.A.d.I., Avaluació i Qualitat en Salut (AIAQS) de Catalunya. Guías de Práctica Clínica en el SNS: AATRM N° 2007/26., ed. (Madrid, .).
- Guerra-Assuncao, J.A., Houben, R.M., Crampin, A.C., Mzembe, T., Mallard, K., Coll, F., Khan, P., Banda, L., Chiwaya, A., Pereira, R.P., McNerney, R., Harris, D., Parkhill, J., Clark, T.G., Glynn, J.R., 2015, Recurrence due to relapse or reinfection with *Mycobacterium tuberculosis*: a whole-genome sequencing approach in a large, population-based cohort with a high HIV infection prevalence and active follow-up. *J Infect Dis* 211, 1154-1163.
- Gurjav, U., Jelfs, P., McCallum, N., Marais, B.J., Sintchenko, V., 2014, Temporal dynamics of *Mycobacterium tuberculosis* genotypes in New South Wales, Australia. *BMC Infect Dis* 14, 455.
- Gutacker, M.M., Smoot, J.C., Migliaccio, C.A., Ricklefs, S.M., Hua, S., Cousins, D.V., Graviss, E.A., Shashkina, E., Kreiswirth, B.N., Musser, J.M., 2002, Genome-wide analysis of synonymous single nucleotide polymorphisms in *Mycobacterium tuberculosis* complex organisms: resolution of genetic relationships among closely related microbial strains. *Genetics* 162, 1533-1543.
- Gutierrez, M., Samper, S., Jimenez, M.S., van Embden, J.D., Marin, J.F., Martin, C., 1997, Identification by spoligotyping of a caprine genotype in *Mycobacterium bovis* strains causing human tuberculosis. *J Clin Microbiol* 35, 3328-3330.
- Gutierrez Reyes, J.A., Casanova, L.G., Torres, C.R., Gallegos, S.L., Alarcon, G.J., Pezzat, M.M., Martinez, O.P., Estrada Chavez, C., Suazo, F.M., 2012, Population structure of *Mycobacterium bovis* isolates from cattle in Mexico. *Prev Vet Med* 106, 1-8.
- Hart, P.D., Sutherland, I., 1977, BCG and vole bacillus vaccines in the prevention of tuberculosis in adolescence and early adult life. *Br Med J* 2, 293-295.
- Hauer, A., De Cruz, K., Cochard, T., Godreuil, S., Karoui, C., Henault, S., Bulach, T., Banuls, A.L., Biet, F., Boschirolì, M.L., 2015, Genetic evolution of *Mycobacterium bovis* causing tuberculosis in livestock and wildlife in France since 1978. *PLoS One* 10, e0117103.
- Henrich, M., Moser, I., Weiss, A., Reinacher, M., 2007, Multiple granulomas in three squirrel monkeys (*Saimiri sciureus*) caused by *Mycobacterium microti*. *J Comp Pathol* 137, 245-248.

- Hewinson, R.G., Vordermeier, H.M., Smith, N.H., Gordon, S.V., 2006, Recent advances in our knowledge of *Mycobacterium bovis*: a feeling for the organism. *Vet Microbiol* 112, 127-139.
- Heym, B., Stavropoulos, E., Honore, N., Domenech, P., Saint-Joanis, B., Wilson, T.M., Collins, D.M., Colston, M.J., Cole, S.T., 1997, Effects of overexpression of the alkyl hydroperoxide reductase AhpC on the virulence and isoniazid resistance of *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect Immun* 65, 1395-1401.
- Hickman, S.P., Chan, J., Salgame, P., 2002, *Mycobacterium tuberculosis* induces differential cytokine production from dendritic cells and macrophages with divergent effects on naive T cell polarization. *J Immunol* 168, 4636-4642.
- Higino, S.S., Pinheiro, S.R., de Souza, G.O., Dib, C.C., do Rosario, T.R., Melville, P.A., Alves, C.J., de Azevedo, S.S., 2011, *Mycobacterium bovis* infection in goats from the Northeast region of Brazil. *Braz J Microbiol* 42, 1437-1439.
- Hilty, M., Diguimbaye, C., Schelling, E., Baggi, F., Tanner, M., Zinsstag, J., 2005, Evaluation of the discriminatory power of variable number tandem repeat (VNTR) typing of *Mycobacterium bovis* strains. *Vet Microbiol* 109, 217-222.
- Hondalus, M.K., Bardarov, S., Russell, R., Chan, J., Jacobs, W.R., Jr., Bloom, B.R., 2000, Attenuation of and protection induced by a leucine auxotroph of *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect Immun* 68, 2888-2898.
- Hoop, R.K., 2002, *Mycobacterium tuberculosis* infection in a canary (*Serinus canaria* L.) and a blue-fronted Amazon parrot (*Amazona amazona aestiva*). *Avian Dis* 46, 502-504.
- Huitema, H., Jaartsveld, F.H., 1967, *Mycobacterium microti* infection in a cat and some pigs. *Antonie Van Leeuwenhoek* 33, 209-212.
- Huyen, M.N., Kremer, K., Lan, N.T., Cobelens, F.G., Buu, T.N., Dung, N.H., Caws, M., Tiemersma, E.W., van Soolingen, D., 2012, Mixed tuberculosis infections in rural South Vietnam. *J Clin Microbiol* 50, 1586-1592.
- Jackson, M., Phalen, S.W., Lagranderie, M., Ensergueix, D., Chavarot, P., Marchal, G., McMurray, D.N., Gicquel, B., Guilhot, C., 1999, Persistence and protective efficacy of a *Mycobacterium tuberculosis* auxotroph vaccine. *Infect Immun* 67, 2867-2873.
- Jamieson, F.B., Teatero, S., Guthrie, J.L., Neemuchwala, A., Fittipaldi, N., Mehaffy, C., 2014, Whole-genome sequencing of the *Mycobacterium tuberculosis* Manila sublineage results in less clustering and better resolution than mycobacterial interspersed repetitive-unit-variable-number tandem-repeat (MIRU-VNTR) typing and spoligotyping. *J Clin Microbiol* 52, 3795-3798.
- Jasmer, R.M., Bozeman, L., Schwartzman, K., Cave, M.D., Saukkonen, J.J., Metchock, B., Khan, A., Burman, W.J., 2004, Recurrent tuberculosis in the United States and Canada: relapse or reinfection? *Am J Respir Crit Care Med* 170, 1360-1366.
- Je, S., Ku, B.K., Jeon, B.Y., Kim, J.M., Jung, S.C., Cho, S.N., 2015, Extent of *Mycobacterium bovis* transmission among animals of dairy and beef cattle and deer farms in South Korea determined by variable-number tandem repeats typing. *Vet Microbiol* 176, 274-281.

- Jenkins, A.O., Cadmus, S.I., Venter, E.H., Pourcel, C., Hauk, Y., Vergnaud, G., Godfroid, J., 2011, Molecular epidemiology of human and animal tuberculosis in Ibadan, Southwestern Nigeria. *Vet Microbiol* 151, 139-147.
- Jensen-Cain, D.M., Quinn, F.D., 2001, Differential expression of *sigE* by *Mycobacterium tuberculosis* during intracellular growth. *Microb Pathog* 30, 271-278.
- Jiang, G., Wang, G., Chen, S., Yu, X., Wang, X., Zhao, L., Ma, Y., Dong, L., Huang, H., 2015, Pulmonary tuberculosis caused by *Mycobacterium bovis* in China. *Sci Rep* 5, 8538.
- Jonsson, J., Hoffner, S., Berggren, I., Bruchfeld, J., Ghebremichael, S., Pennhag, A., Groenheit, R., 2014, Comparison between RFLP and MIRU-VNTR genotyping of *Mycobacterium tuberculosis* strains isolated in Stockholm 2009 to 2011. *PLoS One* 9, e95159.
- Joseph, B.V., Soman, S., Radhakrishnan, I., Hill, V., Dhanasooraj, D., Kumar, R.A., Rastogi, N., Mundayoor, S., 2013, Molecular epidemiology of *Mycobacterium tuberculosis* isolates from Kerala, India using IS6110-RFLP, spoligotyping and MIRU-VNTRs. *Infect Genet Evol* 16, 157-164.
- Jurczynski, K., Lyashchenko, K.P., Gomis, D., Moser, I., Greenwald, R., Moisson, P., 2011, Pinniped tuberculosis in Malayan tapirs (*Tapirus indicus*) and its transmission to other terrestrial mammals. *J Zoo Wildl Med* 42, 222-227.
- Kamat, A.M., Flaig, T.W., Grossman, H.B., Konety, B., Lamm, D., O'Donnell, M.A., Uchio, E., Efsthathiou, J.A., Taylor, J.A., 3rd, 2015, Expert consensus document: Consensus statement on best practice management regarding the use of intravesical immunotherapy with BCG for bladder cancer. *Nat Rev Urol* 12, 225-235.
- Kamerbeek, J., Schouls, L., Kolk, A., van Agterveld, M., van Soolingen, D., Kuijper, S., Bunschoten, A., Molhuizen, H., Shaw, R., Goyal, M., van Embden, J., 1997, Simultaneous detection and strain differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* for diagnosis and epidemiology. *J Clin Microbiol* 35, 907-914.
- Karlson, A.G., Lessel, E.F., 1970, *Mycobacterium bovis* nom. nov. *Int J Syst Bacteriol* 20, 273-282.
- Kassa, G.M., Abebe, F., Worku, Y., Legesse, M., Medhin, G., Bjune, G., Ameni, G., 2012, Tuberculosis in Goats and Sheep in Afar Pastoral Region of Ethiopia and Isolation of *Mycobacterium tuberculosis* from Goat. *Vet Med Int* 2012, 869146.
- Kato-Maeda, M., Ho, C., Passarelli, B., Banaei, N., Grinsdale, J., Flores, L., Anderson, J., Murray, M., Rose, G., Kawamura, L.M., Pourmand, N., Tariq, M.A., Gagneux, S., Hopewell, P.C., 2013, Use of whole genome sequencing to determine the microevolution of *Mycobacterium tuberculosis* during an outbreak. *PLoS One* 8, e58235.
- Keet, D.F., Kriek, N.P., Bengis, R.G., Grobler, D.G., Michel, A., 2000, The rise and fall of tuberculosis in a free-ranging chacma baboon troop in the Kruger National Park. *Onderstepoort J Vet Res* 67, 115-122.
- Kiers, A., Klarenbeek, A., Mendelits, B., Van Soolingen, D., Koeter, G., 2008, Transmission of *Mycobacterium pinnipedii* to humans in a zoo with marine mammals. *Int J Tuberc Lung Dis* 12, 1469-1473.

- Kohl, T.A., Diel, R., Harmsen, D., Rothganger, J., Walter, K.M., Merker, M., Weniger, T., Niemann, S., 2014, Whole-genome-based *Mycobacterium tuberculosis* surveillance: a standardized, portable, and expandable approach. *J Clin Microbiol* 52, 2479-2486.
- Kramnik, I., Dietrich, W.F., Demant, P., Bloom, B.R., 2000, Genetic control of resistance to experimental infection with virulent *Mycobacterium tuberculosis*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 8560-8565.
- Kremer, K., van Soolingen, D., Frothingham, R., Haas, W.H., Hermans, P.W., Martin, C., Palittapongarnpim, P., Plikaytis, B.B., Riley, L.W., Yakus, M.A., Musser, J.M., van Embden, J.D., 1999, Comparison of methods based on different molecular epidemiological markers for typing of *Mycobacterium tuberculosis* complex strains: interlaboratory study of discriminatory power and reproducibility. *J Clin Microbiol* 37, 2607-2618.
- Kubica, T., Rusch-Gerdes, S., Niemann, S., 2003, *Mycobacterium bovis* subsp. *caprae* caused one-third of human *M. bovis*-associated tuberculosis cases reported in Germany between 1999 and 2001. *J Clin Microbiol* 41, 3070-3077.
- Lamichhane, G., Raghunand, T.R., Morrison, N.E., Woolwine, S.C., Tyagi, S., Kandavelou, K., Bishai, W.R., 2006, Deletion of a *Mycobacterium tuberculosis* proteasomal ATPase homologue gene produces a slow-growing strain that persists in host tissues. *J Infect Dis* 194, 1233-1240.
- Lamine-Khemiri, H., Martinez, R., Garcia-Jimenez, W.L., Benitez-Medina, J.M., Cortes, M., Hurtado, I., Abassi, M.S., Khazri, I., Benzarti, M., Hermoso-de-Mendoza, J., 2014, Genotypic characterization by spoligotyping and VNTR typing of *Mycobacterium bovis* and *Mycobacterium caprae* isolates from cattle of Tunisia. *Trop Anim Health Prod* 46, 305-311.
- Lanteri, G., Marino, F., Reale, S., Vitale, F., Macri, F., Mazzullo, G., 2011, *Mycobacterium tuberculosis* in a red-crowned parakeet (*Cyanoramphus novaezelandiae*). *J Avian Med Surg* 25, 40-43.
- Laprie, C., Duboy, J., Malik, R., Fyfe, J., 2013, Feline cutaneous mycobacteriosis: a review of clinical, pathological and molecular characterization of one case of *Mycobacterium microti* skin infection and nine cases of feline leprosy syndrome from France and New Caledonia. *Vet Dermatol* 24, 561-569, e133-564.
- Liebana, E., Aranaz, A., Aldwell, F.E., McNair, J., Neill, S.D., Smyth, A.J., Pollock, J.M., 2000, Cellular interactions in bovine tuberculosis: release of active mycobacteria from infected macrophages by antigen-stimulated T cells. *Immunology* 99, 23-29.
- LoBue, P.A., Betacourt, W., Peter, C., Moser, K.S., 2003, Epidemiology of *Mycobacterium bovis* disease in San Diego County, 1994-2000. *Int J Tuberc Lung Dis* 7, 180-185.
- Loeffler, S.H., de Lisle, G.W., Neill, M.A., Collins, D.M., Price-Carter, M., Paterson, B., Crews, K.B., 2014, The seal tuberculosis agent, *Mycobacterium pinnipedii*, infects domestic cattle in New Zealand: epidemiologic factors and DNA strain typing. *J Wildl Dis* 50, 180-187.
- Lozano, J.A., 2002, Tuberculosis. Patogenia, diagnóstico y tratamiento. *OFFARM* 21, 102-110.

- Luzze, H., Johnson, D.F., Dickman, K., Mayanja-Kizza, H., Okwera, A., Eisenach, K., Cave, M.D., Whalen, C.C., Johnson, J.L., Boom, W.H., Joloba, M., 2013, Relapse more common than reinfection in recurrent tuberculosis 1-2 years post treatment in urban Uganda. *Int J Tuberc Lung Dis* 17, 361-367.
- Lyashchenko, K.P., Greenwald, R., Esfandiari, J., Rhodes, S., Dean, G., de la Rua-Domenech, R., Meylan, M., Vordermeier, H.M., Zanolari, P., 2011, Diagnostic value of animal-side antibody assays for rapid detection of *Mycobacterium bovis* or *Mycobacterium microti* infection in South American camelids. *Clin Vaccine Immunol* 18, 2143-2147.
- Maes, M., Kremer, K., van Soolingen, D., Takiff, H., de Waard, J.H., 2008, 24-locus MIRU-VNTR genotyping is a useful tool to study the molecular epidemiology of tuberculosis among Warao Amerindians in Venezuela. *Tuberculosis (Edinb)* 88, 490-494.
- Mankiewicz, E., Liivak, M., 1975, Phage types of *Mycobacterium tuberculosis* in cultures isolated from Eskimo patients. *Am Rev Respir Dis* 111, 307-312.
- Marianelli, C., Armas, F., Boniotti, M.B., Mazzone, P., Pacciarini, M.L., Di Marco Lo Presti, V., 2015, Multiple drug-susceptibility screening in *Mycobacterium bovis*: new nucleotide polymorphisms in the embB gene among ethambutol susceptible strains. *Int J Infect Dis* 33, 39-44.
- Marianelli, C., Cifani, N., Capucchio, M.T., Fiasconaro, M., Russo, M., La Mancusa, F., Pasquali, P., Di Marco, V., 2010, A case of generalized bovine tuberculosis in a sheep. *J Vet Diagn Invest* 22, 445-448.
- Martin, A., Herranz, M., Lirola, M.M., Fernandez, R.F., Bouza, E., Garcia de Viedma, D., 2008, Optimized molecular resolution of cross-contamination alerts in clinical mycobacteriology laboratories. *BMC Microbiol* 8, 30.
- Martinez-Neri, P.A., Lopez-Rincon, G., Mancilla-Jimenez, R., del Toro-Arreola, S., Munoz-Valle, J.F., Fafutis-Morris, M., Bueno-Topete, M.R., Estrada-Chavez, C., Pereira-Suarez, A.L., 2015, Prolactin modulates cytokine production induced by culture filtrate proteins of *M. bovis* through different signaling mechanisms in THP1 cells. *Cytokine* 71, 38-44.
- Martinho, A.P., Franco, M.M., Ribeiro, M.G., Perrotti, I.B., Mangia, S.H., Megid, J., Vulcano, L.C., Lara, G.H., Santos, A.C., Leite, C.Q., de Carvalho Sanches, O., Paes, A.C., 2013, Disseminated *Mycobacterium tuberculosis* infection in a dog. *Am J Trop Med Hyg* 88, 596-600.
- McEvoy, C.R., Falmer, A.A., Gey van Pittius, N.C., Victor, T.C., van Helden, P.D., Warren, R.M., 2007, The role of IS6110 in the evolution of *Mycobacterium tuberculosis*. *Tuberculosis (Edinb)* 87, 393-404.
- McKinney, J.D., Honer zu Bentrup, K., Munoz-Elias, E.J., Miczak, A., Chen, B., Chan, W.T., Swenson, D., Sacchettini, J.C., Jacobs, W.R., Jr., Russell, D.G., 2000, Persistence of *Mycobacterium tuberculosis* in macrophages and mice requires the glyoxylate shunt enzyme isocitrate lyase. *Nature* 406, 735-738.
- Mehaffy, C., Guthrie, J.L., Alexander, D.C., Stuart, R., Rea, E., Jamieson, F.B., 2014, Marked microevolution of a unique *Mycobacterium tuberculosis* strain in 17 years of ongoing transmission in a high risk population. *PLoS One* 9, e112928.



- Menzies, F.D., Neill, S.D., 2000, Cattle-to-cattle transmission of bovine tuberculosis. *Vet J* 160, 92-106.
- Merker, M., Kohl, T.A., Roetzer, A., Truebe, L., Richter, E., Rusch-Gerdes, S., Fattorini, L., Oggioni, M.R., Cox, H., Varaine, F., Niemann, S., 2013, Whole genome sequencing reveals complex evolution patterns of multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* Beijing strains in patients. *PLoS One* 8, e82551.
- Milian-Suazo, F., Harris, B., Arriaga Diaz, C., Romero Torres, C., Stuber, T., Alvarez Ojeda, G., Morales Loredó, A., Perez Soria, M., Payeur, J.B., 2008, Molecular epidemiology of *Mycobacterium bovis*: usefulness in international trade. *Prev Vet Med* 87, 261-271.
- Mittal, M., Chakravarti, S., Sharma, V., Sanjeeth, B.S., Churamani, C.P., Kanwar, N.S., 2014, Evidence of presence of *Mycobacterium tuberculosis* in bovine tissue samples by multiplex PCR: possible relevance to reverse zoonosis. *Transbound Emerg Dis* 61, 97-104.
- Mohamed, A.M., Abou El-Ella, G.A., Nasr, E.A., 2009, Phenotypic and molecular typing of tuberculous and nontuberculous *Mycobacterium* species from slaughtered pigs in Egypt. *J Vet Diagn Invest* 21, 48-52.
- Monreal, L., Segura, D., Segales, J., Garrido, J.M., Prades, M., 2001, Diagnosis of *Mycobacterium bovis* infection in a mare. *Vet Rec* 149, 712-714.
- Moser, I., Prodinger, W.M., Hotzel, H., Greenwald, R., Lyashchenko, K.P., Bakker, D., Gomis, D., Seidler, T., Ellenberger, C., Hetzel, U., Wuennemann, K., Moisson, P., 2008, *Mycobacterium pinnipedii*: transmission from South American sea lion (*Otaria byronia*) to Bactrian camel (*Camelus bactrianus bactrianus*) and Malayan tapirs (*Tapirus indicus*). *Vet Microbiol* 127, 399-406.
- Mostowy, S., Cousins, D., Behr, M.A., 2004, Genomic interrogation of the dassie bacillus reveals it as a unique RD1 mutant within the *Mycobacterium tuberculosis* complex. *J Bacteriol* 186, 104-109.
- Munoz Mendoza, M., Juan, L., Menendez, S., Ocampo, A., Mourelo, J., Saez, J.L., Dominguez, L., Gortazar, C., Garcia Marin, J.F., Balseiro, A., 2012, Tuberculosis due to *Mycobacterium bovis* and *Mycobacterium caprae* in sheep. *Vet J* 191, 267-269.
- Murray, A., Dineen, A., Kelly, P., McGoey, K., Madigan, G., NiGhallchoir, E., Gunn-Moore, D.A., 2015, Nosocomial spread of *Mycobacterium bovis* in domestic cats. *J Feline Med Surg* 17, 173-180.
- Muwonge, A., Johansen, T.B., Vigdis, E., Godfroid, J., Olea-Popelka, F., Biffa, D., Skjerve, E., Djonje, B., 2012, *Mycobacterium bovis* infections in slaughter pigs in Mubende district, Uganda: a public health concern. *BMC Vet Res* 8, 168.
- Nabyonga, L., Kateete, D.P., Katabazi, F.A., Odong, P.R., Whalen, C.C., Dickman, K.R., Moses, J.L., 2011, Determination of circulating *Mycobacterium tuberculosis* strains and transmission patterns among pulmonary TB patients in Kawempe municipality, Uganda, using MIRU-VNTR. *BMC Res Notes* 4, 280.
- Narayanan, S., Swaminathan, S., Supply, P., Shanmugam, S., Narendran, G., Hari, L., Ramachandran, R., Loch, C., Jawahar, M.S., Narayanan, P.R., 2010, Impact of HIV infection on the recurrence of tuberculosis in South India. *J Infect Dis* 201, 691-703.

- Navas Elorza, E., Moreno Guillen, S., 2010, Multidrug resistant TB and extensively drug resistant TB. *Res Esp Sanid Penit* 12, 91-98.
- Neill, S.D., O'Brien, J.J., Hanna, J., 1991, A mathematical model for *Mycobacterium bovis* excretion from tuberculous cattle. *Vet Microbiol* 28, 103-109.
- Niemann, S., Richter, E., Dalugge-Tamm, H., Schlesinger, H., Graupner, D., Konigstein, B., Gurath, G., Greinert, U., Rusch-Gerdes, S., 2000, Two cases of *Mycobacterium microti* derived tuberculosis in HIV-negative immunocompetent patients. *Emerg Infect Dis* 6, 539-542.
- O'Reilly, L.M., Daborn, C.J., 1995, The epidemiology of *Mycobacterium bovis* infections in animals and man: a review. *Tuber Lung Dis* 76 Suppl 1, 1-46.
- Ocepek, M., Pate, M., Zolnir-Dovc, M., Poljak, M., 2005, Transmission of *Mycobacterium tuberculosis* from human to cattle. *J Clin Microbiol* 43, 3555-3557.
- OIE 2011. Código Sanitario para los Animales Terrestres. Capítulo 11.6 Tuberculosis bovina (World Organisation for Animal Health).
- OIE 2012. Manual de la OIE sobre animales terrestres 2012. Capítulo 2.4.7. Tuberculosis Bovina (World Organisation for Animal Health).
- OIE 2015. Tuberculosis bovina. Fichas de información general sobre enfermedades animales, Health, W.O.f.A., ed.
- Olsen, I., Balasingham, S.V., Davidsen, T., Debebe, E., Rodland, E.A., van Soolingen, D., Kremer, K., Alseth, I., Tonjum, T., 2009, Characterization of the major formamidopyrimidine-DNA glycosylase homolog in *Mycobacterium tuberculosis* and its linkage to variable tandem repeats. *FEMS Immunol Med Microbiol* 56, 151-161.
- Palgrave, C.J., Benato, L., Eatwell, K., Laurenson, I.F., Smith, N.H., 2012, *Mycobacterium microti* infection in two meerkats (*Suricata suricatta*). *J Comp Pathol* 146, 278-282.
- Palmer, M.V., 2013, *Mycobacterium bovis*: characteristics of wildlife reservoir hosts. *Transbound Emerg Dis* 60 Suppl 1, 1-13.
- Palomino, J.C., Leao, S.C., Ritacco, V., 2007, Tuberculosis 2007. From Basic Science to Patient Care, First Edition.
- Panteix, G., Gutierrez, M.C., Boschirolì, M.L., Rouviere, M., Plaidy, A., Pressac, D., Porcheret, H., Chyderiotis, G., Ponsada, M., Van Oortegem, K., Salloum, S., Cabuzel, S., Banuls, A.L., Van de Perre, P., Godreuil, S., 2010, Pulmonary tuberculosis due to *Mycobacterium microti*: a study of six recent cases in France. *J Med Microbiol* 59, 984-989.
- Parish, T., Brown, A. 2009. *Mycobacterium Genomics and Molecular Biology* (Caister Academic Press).
- Parra, A., Fernandez-Llario, P., Tato, A., Larrasa, J., Garcia, A., Alonso, J.M., Hermoso de Mendoza, M., Hermoso de Mendoza, J., 2003, Epidemiology of *Mycobacterium bovis* infections of pigs and wild boars using a molecular approach. *Vet Microbiol* 97, 123-133.

- Parrish, N., Dionne, K., Sweeney, A., Hedgepeth, A., Carroll, K., 2009, Differences in time to detection and recovery of *Mycobacterium* spp. between the MGIT 960 and the BacT/ALERT MB automated culture systems. *Diagn Microbiol Infect Dis* 63, 342-345.
- Parsons, S.D., Drewe, J.A., Gey van Pittius, N.C., Warren, R.M., van Helden, P.D., 2013, Novel cause of tuberculosis in meerkats, South Africa. *Emerg Infect Dis* 19, 2004-2007.
- Paudel, S., Mikota, S.K., Nakajima, C., Gairhe, K.P., Maharjan, B., Thapa, J., Poudel, A., Shimozuru, M., Suzuki, Y., Tsubota, T., 2014, Molecular characterization of *Mycobacterium tuberculosis* isolates from elephants of Nepal. *Tuberculosis (Edinb)* 94, 287-292.
- Peng, Y., Yang, C., Li, X., Luo, T., Li, F., Gao, Q., 2013, Multiple samples improve the sensitivity for detection of mixed *Mycobacterium* infections. *Tuberculosis (Edinb)* 93, 548-550.
- Perez-Lago, L., Comas, I., Navarro, Y., Gonzalez-Candelas, F., Herranz, M., Bouza, E., Garcia-de-Viedma, D., 2014a, Whole genome sequencing analysis of inpatient microevolution in *Mycobacterium tuberculosis*: potential impact on the inference of tuberculosis transmission. *J Infect Dis* 209, 98-108.
- Perez-Lago, L., Navarro, Y., Garcia-de-Viedma, D., 2014b, Current knowledge and pending challenges in zoonosis caused by *Mycobacterium bovis*: a review. *Res Vet Sci* 97 Suppl, S94-S100.
- Perez, E., Samper, S., Bordas, Y., Guilhot, C., Gicquel, B., Martin, C., 2001, An essential role for *phoP* in *Mycobacterium tuberculosis* virulence. *Mol Microbiol* 41, 179-187.
- Pfyffer, G.E., Auckenthaler, R., van Embden, J.D., van Soolingen, D., 1998, *Mycobacterium canettii*, the smooth variant of *M. tuberculosis*, isolated from a Swiss patient exposed in Africa. *Emerg Infect Dis* 4, 631-634.
- Pritchard, D.G., 1988, A century of bovine tuberculosis 1888-1988: conquest and controversy. *J Comp Pathol* 99, 357-399.
- Proding, W.M., Brandstatter, A., Naumann, L., Pacciarini, M., Kubica, T., Boschirol, M.L., Aranaz, A., Nagy, G., Cvetnic, Z., Oceppek, M., Skrypnik, A., Erler, W., Niemann, S., Pavlik, I., Moser, I., 2005, Characterization of *Mycobacterium caprae* isolates from Europe by mycobacterial interspersed repetitive unit genotyping. *J Clin Microbiol* 43, 4984-4992.
- Rahim, Z., Mollers, M., te Koppele-Vije, A., de Beer, J., Zaman, K., Matin, M.A., Kamal, M., Raquib, R., van Soolingen, D., Baqi, M.A., Heilmann, F.G., van der Zanden, A.G., 2007, Characterization of *Mycobacterium africanum* subtype I among cows in a dairy farm in Bangladesh using spoligotyping. *Southeast Asian J Trop Med Public Health* 38, 706-713.
- Ramdas, K.E., Lyashchenko, K.P., Greenwald, R., Robbe-Austerman, S., McManis, C., Waters, W.R., 2015, *Mycobacterium bovis* infection in humans and cats in same household, Texas, USA, 2012. *Emerg Infect Dis* 21, 480-483.
- Ramos, D.F., Tavares, L., da Silva, P.E., Dellagostin, O.A., 2014, Molecular typing of *Mycobacterium bovis* isolates: a review. *Braz J Microbiol* 45, 365-372.

- Raynaud, C., Guilhot, C., Rauzier, J., Bordat, Y., Pelicic, V., Manganelli, R., Smith, I., Gicquel, B., Jackson, M., 2002, Phospholipases C are involved in the virulence of *Mycobacterium tuberculosis*. *Mol Microbiol* 45, 203-217.
- Reddy, T.B., Riley, R., Wymore, F., Montgomery, P., DeCaprio, D., Engels, R., Gellesch, M., Hubble, J., Jen, D., Jin, H., Koehrsen, M., Larson, L., Mao, M., Nitzberg, M., Sisk, P., Stolte, C., Weiner, B., White, J., Zachariah, Z.K., Sherlock, G., Galagan, J.E., Ball, C.A., Schoolnik, G.K., 2009, TB database: an integrated platform for tuberculosis research. *Nucleic Acids Res* 37, D499-508.
- Renvoise, A., Pang, S., Bernard, C., Brossier, F., Veziris, N., Capton, E., Jarlier, V., Sougakoff, W., 2014, First Whole-Genome Sequence of a Clinical Isolate of Multidrug-Resistant *Mycobacterium bovis* BCG. *Genome Announc* 2.
- Rindi, L., Fattorini, L., Bonanni, D., Iona, E., Freer, G., Tan, D., Deho, G., Orefici, G., Garzelli, C., 2002, Involvement of the fadD33 gene in the growth of *Mycobacterium tuberculosis* in the liver of BALB/c mice. *Microbiology* 148, 3873-3880.
- Roberts, T., O'Connor, C., Nunez-Garcia, J., de la Rua-Domenech, R., Smith, N.H., 2014, Unusual cluster of *Mycobacterium bovis* infection in cats. *Vet Rec* 174, 326.
- Rodriguez-Campos, S., Navarro, Y., Romero, B., de Juan, L., Bezos, J., Mateos, A., Golby, P., Smith, N.H., Hewinson, G.R., Dominguez, L., Garcia-de-Viedma, D., Aranaz, A., 2013, Splitting of a prevalent *Mycobacterium bovis* spoligotype by variable-number tandem-repeat typing reveals high heterogeneity in an evolving clonal group. *J Clin Microbiol* 51, 3658-3665.
- Rodriguez, E., Sanchez, L.P., Perez, S., Herrera, L., Jimenez, M.S., Samper, S., Iglesias, M.J., 2009, Human tuberculosis due to *Mycobacterium bovis* and *M. caprae* in Spain, 2004-2007. *Int J Tuberc Lung Dis* 13, 1536-1541.
- Rodriguez, S., Bezos, J., Romero, B., de Juan, L., Alvarez, J., Castellanos, E., Moya, N., Lozano, F., Javed, M.T., Saez-Llorente, J.L., Liebana, E., Mateos, A., Dominguez, L., Aranaz, A., 2011, *Mycobacterium caprae* infection in livestock and wildlife, Spain. *Emerg Infect Dis* 17, 532-535.
- Rodriguez, S., Romero, B., Bezos, J., de Juan, L., Alvarez, J., Castellanos, E., Moya, N., Lozano, F., Gonzalez, S., Saez-Llorente, J.L., Mateos, A., Dominguez, L., Aranaz, A., 2010, High spoligotype diversity within a *Mycobacterium bovis* population: clues to understanding the demography of the pathogen in Europe. *Vet Microbiol* 141, 89-95.
- Rodriguez Valin, E., O, T.A. 2012. Informe epidemiológico sobre la situación de la tuberculosis en España (Madrid, Centro Nacional de Epidemiología. Instituto de Salud Carlos III).
- Roetzer, A., Diel, R., Kohl, T.A., Ruckert, C., Nubel, U., Blom, J., Wirth, T., Jaenicke, S., Schuback, S., Rusch-Gerdes, S., Supply, P., Kalinowski, J., Niemann, S., 2013, Whole genome sequencing versus traditional genotyping for investigation of a *Mycobacterium tuberculosis* outbreak: a longitudinal molecular epidemiological study. *PLoS Med* 10, e1001387.
- Romero, B., Rodriguez, S., Bezos, J., Diaz, R., Copano, M.F., Merediz, I., Minguez, O., Marques, S., Palacios, J.J., Garcia de Viedma, D., Saez, J.L., Mateos, A., Aranaz, A.,

- Dominguez, L., de Juan, L., 2011, Humans as source of *Mycobacterium tuberculosis* infection in cattle, Spain. *Emerg Infect Dis* 17, 2393-2395.
- Roring, S., Scott, A.N., Glyn Hewinson, R., Neill, S.D., Skuce, R.A., 2004, Evaluation of variable number tandem repeat (VNTR) loci in molecular typing of *Mycobacterium bovis* isolates from Ireland. *Vet Microbiol* 101, 65-73.
- Rothel, J.S., Jones, S.L., Corner, L.A., Cox, J.C., Wood, P.R., 1990, A sandwich enzyme immunoassay for bovine interferon-gamma and its use for the detection of tuberculosis in cattle. *Aust Vet J* 67, 134-137.
- Rufenacht, S., Bogli-Stuber, K., Bodmer, T., Jaunin, V.F., Jmaa, D.C., Gunn-Moore, D.A., 2011, *Mycobacterium microti* infection in the cat: a case report, literature review and recent clinical experience. *J Feline Med Surg* 13, 195-204.
- Saikolappan, S., Estrella, J., Sasindran, S.J., Khan, A., Armitige, L.Y., Jagannath, C., Dhandayuthapani, S., 2012, The fbpA/sapM double knock out strain of *Mycobacterium tuberculosis* is highly attenuated and immunogenic in macrophages. *PLoS One* 7, e36198.
- Sakula, A., 1982, Robert Koch: centenary of the discovery of the tubercle bacillus, 1882. *Thorax* 37, 246-251.
- Sambandamurthy, V.K., Wang, X., Chen, B., Russell, R.G., Derrick, S., Collins, F.M., Morris, S.L., Jacobs, W.R., Jr., 2002, A pantothenate auxotroph of *Mycobacterium tuberculosis* is highly attenuated and protects mice against tuberculosis. *Nat Med* 8, 1171-1174.
- Sarradell, J.E., Alvarez, J., Biscia, M., Zumarraga, M., Wunschmann, A., Armien, A.G., Perez, A.M., 2015, *Mycobacterium bovis* infection in a horse with granulomatous enterocolitis. *J Vet Diagn Invest* 27, 203-205.
- Schoepf, K., Prodingner, W.M., Glawischnig, W., Hofer, E., Revilla-Fernandez, S., Hofrichter, J., Fritz, J., Kofer, J., Schmoll, F., 2012, A Two-Years' Survey on the Prevalence of Tuberculosis Caused by *Mycobacterium caprae* in Red Deer (*Cervus elaphus*) in the Tyrol, Austria. *ISRN Vet Sci* 2012, 245138.
- Shamputa, I.C., Jugheli, L., Sadradze, N., Willery, E., Portaels, F., Supply, P., Rigouts, L., 2006, Mixed infection and clonal representativeness of a single sputum sample in tuberculosis patients from a penitentiary hospital in Georgia. *Respir Res* 7, 99.
- Shamputa, I.C., Rigouts, L., Eyongeta, L.A., El Aila, N.A., van Deun, A., Salim, A.H., Willery, E., Loch, C., Supply, P., Portaels, F., 2004, Genotypic and phenotypic heterogeneity among *Mycobacterium tuberculosis* isolates from pulmonary tuberculosis patients. *J Clin Microbiol* 42, 5528-5536.
- Shrikrishna, D., de la Rua-Domenech, R., Smith, N.H., Colloff, A., Coutts, I., 2009, Human and canine pulmonary *Mycobacterium bovis* infection in the same household: re-emergence of an old zoonotic threat? *Thorax* 64, 89-91.
- Silva Miranda, M., Breiman, A., Allain, S., Deknuydt, F., Altare, F., 2012, The tuberculous granuloma: an unsuccessful host defence mechanism providing a safety shelter for the bacteria? *Clin Dev Immunol* 2012, 139127.

- Singh, S., Kumar, M., Singh, P., 2015, Evolution of *M. bovis* BCG Vaccine: Is Niacin Production Still a Valid Biomarker? *Tuberc Res Treat* 2015, 957519.
- Skjot, R.L., Oettinger, T., Rosenkrands, I., Ravn, P., Brock, I., Jacobsen, S., Andersen, P., 2000, Comparative evaluation of low-molecular-mass proteins from *Mycobacterium tuberculosis* identifies members of the ESAT-6 family as immunodominant T-cell antigens. *Infect Immun* 68, 214-220.
- Skuce, R.A., McDowell, S.W., Mallon, T.R., Luke, B., Breadon, E.L., Lagan, P.L., McCormick, C.M., McBride, S.H., Pollock, J.M., 2005, Discrimination of isolates of *Mycobacterium bovis* in Northern Ireland on the basis of variable numbers of tandem repeats (VNTRs). *Vet Rec* 157, 501-504.
- Small, P.M., Hopewell, P.C., Singh, S.P., Paz, A., Parsonnet, J., Ruston, D.C., Schechter, G.F., Daley, C.L., Schoolnik, G.K., 1994, The epidemiology of tuberculosis in San Francisco. A population-based study using conventional and molecular methods. *N Engl J Med* 330, 1703-1709.
- Smith, D.A., Parish, T., Stoker, N.G., Bancroft, G.J., 2001, Characterization of auxotrophic mutants of *Mycobacterium tuberculosis* and their potential as vaccine candidates. *Infect Immun* 69, 1142-1150.
- Smith, I., 2003, *Mycobacterium tuberculosis* pathogenesis and molecular determinants of virulence. *Clin Microbiol Rev* 16, 463-496.
- Smith, N., 1960, The 'Dassie' bacillus. *Tubercle* 41, 203-212.
- Sonnenberg, M.G., Belisle, J.T., 1997, Definition of *Mycobacterium tuberculosis* culture filtrate proteins by two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis, N-terminal amino acid sequencing, and electrospray mass spectrometry. *Infect Immun* 65, 4515-4524.
- Stamp, J.T., 1948, Bovine pulmonary tuberculosis. *J Comp Pathol Ther* 58, 9-23.
- Steenken, W., Jr., Gardner, L.U., 1946, History of H37 strain of tubercle bacillus. *Am Rev Tuberc* 54, 62-66.
- Steenken, W., Oatway, W.H., Petroff, S.A., 1934, Biological Studies of the Tubercle Bacillus : lii. Dissociation and Pathogenicity of the R and S Variants of the Human Tubercle Bacillus (H(37)). *J Exp Med* 60, 515-540.
- Stokes, R.W., Doxsee, D., 1999, The receptor-mediated uptake, survival, replication, and drug sensitivity of *Mycobacterium tuberculosis* within the macrophage-like cell line THP-1: a comparison with human monocyte-derived macrophages. *Cell Immunol* 197, 1-9.
- Stucki, D., Ballif, M., Bodmer, T., Coscolla, M., Maurer, A.M., Droz, S., Butz, C., Borrell, S., Langle, C., Feldmann, J., Furrer, H., Mordasini, C., Helbling, P., Rieder, H.L., Egger, M., Gagneux, S., Fenner, L., 2015, Tracking a tuberculosis outbreak over 21 years: strain-specific single-nucleotide polymorphism typing combined with targeted whole-genome sequencing. *J Infect Dis* 211, 1306-1316.
- Subbian, S., Tsenova, L., Yang, G., O'Brien, P., Parsons, S., Peixoto, B., Taylor, L., Fallows, D., Kaplan, G., 2011, Chronic pulmonary cavitary tuberculosis in rabbits: a failed host immune response. *Open Biol* 1, 110016.

- Sula, L., Radkovsky, I., 1976, Protective effects of *M. microti* vaccine against tuberculosis. J Hyg Epidemiol Microbiol Immunol 20, 1-6.
- Sun, Z., Cao, R., Tian, M., Zhang, X., Li, Y., Xu, Y., Fan, W., Huang, B., Li, C., 2012, Evaluation of Spoligotyping and MIRU-VNTR for *Mycobacterium bovis* in Xinjiang, China. Res Vet Sci 92, 236-239.
- Sunder, S., Lanotte, P., Godreuil, S., Martin, C., Boschirol, M.L., Besnier, J.M., 2009, Human-to-human transmission of tuberculosis caused by *Mycobacterium bovis* in immunocompetent patients. J Clin Microbiol 47, 1249-1251.
- Supply, P. 2006. Protocol and Guidelines for Multilocus Variable Number Tandem Repeat Genotyping of *M. bovis*. In VENoMYC (EU coordination action SSPE-CT-2004-501903) WP7 Workshop (Toledo (Spain)), pp. 15-16.
- Supply, P., Allix, C., Lesjean, S., Cardoso-Oelemann, M., Rusch-Gerdes, S., Willery, E., Savine, E., de Haas, P., van Deutekom, H., Roring, S., Bifani, P., Kurepina, N., Kreiswirth, B., Sola, C., Rastogi, N., Vatin, V., Gutierrez, M.C., Fauville, M., Niemann, S., Skuce, R., Kremer, K., Locht, C., van Soolingen, D., 2006, Proposal for standardization of optimized mycobacterial interspersed repetitive unit-variable-number tandem repeat typing of *Mycobacterium tuberculosis*. J Clin Microbiol 44, 4498-4510.
- Supply, P., Gaudin, C., Raze, D., 2014, Optimization of standard 24-locus variable-number tandem-repeat typing of *Mycobacterium tuberculosis* isolates: a multicenter perspective. J Clin Microbiol 52, 3518-3519.
- Supply, P., Lesjean, S., Savine, E., Kremer, K., van Soolingen, D., Locht, C., 2001, Automated high-throughput genotyping for study of global epidemiology of *Mycobacterium tuberculosis* based on mycobacterial interspersed repetitive units. J Clin Microbiol 39, 3563-3571.
- Supply, P., Marceau, M., Mangenot, S., Roche, D., Rouanet, C., Khanna, V., Majlessi, L., Criscuolo, A., Tap, J., Pawlik, A., Fiette, L., Orgeur, M., Fabre, M., Parmentier, C., Frigui, W., Simeone, R., Boritsch, E.C., Debie, A.S., Willery, E., Walker, D., Quail, M.A., Ma, L., Bouchier, C., Salvignol, G., Sayes, F., Cascioferro, A., Seemann, T., Barbe, V., Locht, C., Gutierrez, M.C., Leclerc, C., Bentley, S.D., Stinear, T.P., Brisse, S., Medigue, C., Parkhill, J., Cruveiller, S., Brosch, R., 2013, Genomic analysis of smooth tubercle bacilli provides insights into ancestry and pathoadaptation of *Mycobacterium tuberculosis*. Nat Genet 45, 172-179.
- Supply, P., Mazars, E., Lesjean, S., Vincent, V., Gicquel, B., Locht, C., 2000, Variable human minisatellite-like regions in the *Mycobacterium tuberculosis* genome. Mol Microbiol 36, 762-771.
- Tantivitayakul, P., Panapruksachat, S., Billamas, P., Palittapongarnpim, P., 2010, Variable number of tandem repeat sequences act as regulatory elements in *Mycobacterium tuberculosis*. Tuberculosis (Edinb) 90, 311-318.
- Taylor, C., Jahans, K., Palmer, S., Okker, M., Brown, J., Steer, K., 2006, *Mycobacterium microti* isolated from two pigs. Vet Rec 159, 59-60.
- Thakur, A., Sharma, M., Katoch, V.C., Dhar, P., Katoch, R.C., 2012, Detection of *Mycobacterium bovis* and *Mycobacterium tuberculosis* from Cattle: Possible Public Health Relevance. Indian J Microbiol 52, 289-291.

- Theus, S.A., Cave, M.D., Eisenach, K.D., 2004, Activated THP-1 cells: an attractive model for the assessment of intracellular growth rates of *Mycobacterium tuberculosis* isolates. *Infect Immun* 72, 1169-1173.
- Thompson, P.J., Cousins, D.V., Gow, B.L., Collins, D.M., Williamson, B.H., Dagnia, H.T., 1993, Seals, seal trainers, and mycobacterial infection. *Am Rev Respir Dis* 147, 164-167.
- Thorel, M.F., Karoui, C., Varnerot, A., Fleury, C., Vincent, V., 1998, Isolation of *Mycobacterium bovis* from baboons, leopards and a sea-lion. *Vet Res* 29, 207-212.
- Trunz, B.B., Fine, P., Dye, C., 2006, Effect of BCG vaccination on childhood tuberculous meningitis and miliary tuberculosis worldwide: a meta-analysis and assessment of cost-effectiveness. *Lancet* 367, 1173-1180.
- van der Zanden, A.G., Kremer, K., Schouls, L.M., Caimi, K., Cataldi, A., Hulleman, A., Nagelkerke, N.J., van Soolingen, D., 2002, Improvement of differentiation and interpretability of spoligotyping for *Mycobacterium tuberculosis* complex isolates by introduction of new spacer oligonucleotides. *J Clin Microbiol* 40, 4628-4639.
- van Deutekom, H., Gerritsen, J.J., van Soolingen, D., van Ameijden, E.J., van Embden, J.D., Coutinho, R.A., 1997, A molecular epidemiological approach to studying the transmission of tuberculosis in Amsterdam. *Clin Infect Dis* 25, 1071-1077.
- van Embden, J.D., van Gorkom, T., Kremer, K., Jansen, R., van Der Zeijst, B.A., Schouls, L.M., 2000, Genetic variation and evolutionary origin of the direct repeat locus of *Mycobacterium tuberculosis* complex bacteria. *J Bacteriol* 182, 2393-2401.
- van Ingen, J., Rahim, Z., Mulder, A., Boeree, M.J., Simeone, R., Brosch, R., van Soolingen, D., 2012, Characterization of *Mycobacterium orygis* as *M. tuberculosis* complex subspecies. *Emerg Infect Dis* 18, 653-655.
- van Rie, A., Victor, T.C., Richardson, M., Johnson, R., van der Spuy, G.D., Murray, E.J., Beyers, N., Gey van Pittius, N.C., van Helden, P.D., Warren, R.M., 2005, Reinfection and mixed infection cause changing *Mycobacterium tuberculosis* drug-resistance patterns. *Am J Respir Crit Care Med* 172, 636-642.
- van Rie, A., Warren, R., Richardson, M., Victor, T.C., Gie, R.P., Enarson, D.A., Beyers, N., van Helden, P.D., 1999, Exogenous reinfection as a cause of recurrent tuberculosis after curative treatment. *N Engl J Med* 341, 1174-1179.
- van Soolingen, D., Borgdorff, M.W., de Haas, P.E., Sebek, M.M., Veen, J., Dessens, M., Kremer, K., van Embden, J.D., 1999, Molecular epidemiology of tuberculosis in the Netherlands: a nationwide study from 1993 through 1997. *J Infect Dis* 180, 726-736.
- van Soolingen, D., de Haas, P.E., Hermans, P.W., Groenen, P.M., van Embden, J.D., 1993, Comparison of various repetitive DNA elements as genetic markers for strain differentiation and epidemiology of *Mycobacterium tuberculosis*. *J Clin Microbiol* 31, 1987-1995.
- van Soolingen, D., Hoogenboezem, T., de Haas, P.E., Hermans, P.W., Koedam, M.A., Teppema, K.S., Brennan, P.J., Besra, G.S., Portaels, F., Top, J., Schouls, L.M., van Embden, J.D., 1997, A novel pathogenic taxon of the *Mycobacterium tuberculosis* complex, Canetti: characterization of an exceptional isolate from Africa. *Int J Syst Bacteriol* 47, 1236-1245.



- Vandal, O.H., Roberts, J.A., Odaira, T., Schnappinger, D., Nathan, C.F., Ehrh, S., 2009, Acid-susceptible mutants of *Mycobacterium tuberculosis* share hypersusceptibility to cell wall and oxidative stress and to the host environment. *J Bacteriol* 191, 625-631.
- Vasconcellos, S.E., Acosta, C.C., Gomes, L.L., Conceicao, E.C., Lima, K.V., de Araujo, M.I., Leite Mde, L., Tannure, F., Caldas, P.C., Gomes, H.M., Santos, A.R., Gomgnimbou, M.K., Sola, C., Couvin, D., Rastogi, N., Boechat, N., Suffys, P.N., 2014, Strain classification of *Mycobacterium tuberculosis* isolates in Brazil based on genotypes obtained by spoligotyping, mycobacterial interspersed repetitive unit typing and the presence of large sequence and single nucleotide polymorphism. *PLoS One* 9, e107747.
- Vogelneust, L., Hulst, F., Thompson, P., Lyashchenko, K.P., Herrin, K.A., 2015, Diagnosis and management of tuberculosis (*Mycobacterium tuberculosis*) in an Asian elephant (*Elephas maximus*) with a newborn CALF. *J Zoo Wildl Med* 46, 77-85.
- Vordermeier, H.M., Perez de Val, B., Buddle, B.M., Villarreal-Ramos, B., Jones, G.J., Hewinson, R.G., Domingo, M., 2014, Vaccination of domestic animals against tuberculosis: review of progress and contributions to the field of the TBSTEP project. *Res Vet Sci* 97 Suppl, S53-60.
- Wagner, J.C., Buchanan, G., Bokkenheuser, V., Leviser, S., 1958, An acid-fast bacillus isolated from the lungs of the Cape hyrax, *Procavia capensis* (Pallas). *Nature* 181, 284-285.
- Walker, T.M., Ip, C.L., Harrell, R.H., Evans, J.T., Kapatai, G., Dedicoat, M.J., Eyre, D.W., Wilson, D.J., Hawkey, P.M., Crook, D.W., Parkhill, J., Harris, D., Walker, A.S., Bowden, R., Monk, P., Smith, E.G., Peto, T.E., 2013, Whole-genome sequencing to delineate *Mycobacterium tuberculosis* outbreaks: a retrospective observational study. *Lancet Infect Dis* 13, 137-146.
- Warren, R.M., Victor, T.C., Streicher, E.M., Richardson, M., Beyers, N., Gey van Pittius, N.C., van Helden, P.D., 2004, Patients with active tuberculosis often have different strains in the same sputum specimen. *Am J Respir Crit Care Med* 169, 610-614.
- Wells, A.Q., Oxen, D.M., 1937, Tuberculosis in voles. *Lancet* 1, 1221.
- WHO 2006. International Standards for Tuberculosis Care (ISTC), Assistance, T.C.f.T., ed.
- WHO 2008. Molecular line probe assays for rapid screening of patients at risk of multi-drug resistant tuberculosis (MDR-TB) (Special Programme for Research & Training for Tropical Diseases (TDR) sponsored by UNICEF/UNDP/World Bank/WHO).
- WHO 2014a. Global tuberculosis report 2014 (World Health Organization).
- WHO 2014b. Informe mundial sobre la tuberculosis 2013 (World Health Organization).
- WHO 2014c. Multidrug-resistant tuberculosis (MDR-TB) 2014 Update (World Health Organization)
- WHO 2015. Tuberculosis. Fact sheet N°104 (World Health Organization) <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs104/en/>
- Wilson, T.M., de Lisle, G.W., Collins, D.M., 1995, Effect of inhA and katG on isoniazid resistance and virulence of *Mycobacterium bovis*. *Mol Microbiol* 15, 1009-1015.

- Woods, G.L., 2000, Susceptibility testing for mycobacteria. Clin Infect Dis 31, 1209-1215.
- Xavier Emmanuel, F., Seagar, A.L., Doig, C., Rayner, A., Claxton, P., Laurenson, I., 2007, Human and animal infections with *Mycobacterium microti*, Scotland. Emerg Infect Dis 13, 1924-1927.
- Yang, L., Wang, C., Wang, H., Meng, Q., Wang, Q., 2015, Evaluation of MIRU-VNTR for typing of *Mycobacterium bovis* isolated from Sika deer in Northeast China. BMC Vet Res 11, 93.
- Yindeeyoungyeon, W., Likitvivatanavong, S., Palittapongarnpim, P., 2009, Characterization of alpha-isopropylmalate synthases containing different copy numbers of tandem repeats in *Mycobacterium tuberculosis*. BMC Microbiol 9, 122.
- Yokobori, N., Lopez, B., Geffner, L., Sabio y Garcia, C., Schierloh, P., Barrera, L., de la Barrera, S., Sakai, S., Kawamura, I., Mitsuyama, M., Ritacco, V., Sasiain Mdel, C., 2013, Two genetically-related multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* strains induce divergent outcomes of infection in two human macrophage models. Infect Genet Evol 16, 151-156.
- Zanardi, G., Boniotti, M.B., Gaffuri, A., Casto, B., Zanoni, M., Pacciarini, M.L., 2013, Tuberculosis transmission by *Mycobacterium bovis* in a mixed cattle and goat herd. Res Vet Sci 95, 430-433.
- Zanella, G., Durand, B., Hars, J., Moutou, F., Garin-Bastuji, B., Duvauchelle, A., Ferme, M., Karoui, C., Boschirolì, M.L., 2008, *Mycobacterium bovis* in wildlife in France. J Wildl Dis 44, 99-108.
- Zanolari, P., Robert, N., Lyashchenko, K.P., Pfyffer, G.E., Greenwald, R., Esfandiari, J., Meylan, M., 2009, Tuberculosis caused by *Mycobacterium microti* in South American camelids. J Vet Intern Med 23, 1266-1272.
- Zhang, X., Li, S., Luo, Y., Chen, Y., Cheng, S., Zhang, G., Hu, C., Chen, H., Guo, A., 2013, *Mycobacterium bovis* and BCG induce different patterns of cytokine and chemokine production in dendritic cells and differentiation patterns in CD4<sup>+</sup> T cells. Microbiology 159, 366-379.
- Zumarraga, M.J., Arriaga, C., Barandiaran, S., Cobos-Marin, L., de Waard, J., Estrada-Garcia, I., Figueiredo, T., Figueroa, A., Gimenez, F., Gomes, H.M., Gonzalez, Y.M.J.A., Macias, A., Milian-Suazo, F., Rodriguez, C.A., Santillan, M.A., Suffys, P.N., Trangoni, M.D., Zarraga, A.M., Cataldi, A., 2013, Understanding the relationship between *Mycobacterium bovis* spoligotypes from cattle in Latin American countries. Res Vet Sci 94, 9-21.